



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Bioquímica

**IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES DE LA  
INTERNALIZACIÓN DE CAVEOLINA-1 INDUCIDA POR LA  
PÉRDIDA DE ADHESIÓN CELULAR.  
REGULACIÓN POR FILAMINA-A.**

Olivia Muriel López

Madrid, 2011

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Departamento de Bioquímica**

**IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES DE LA  
INTERNALIZACIÓN DE CAVEOLINA-1 INDUCIDA POR  
LA PÉRDIDA DE ADHESIÓN CELULAR.  
REGULACIÓN POR FILAMINA-A.**

**Olivia Muriel López**

**Madrid, 2011**



**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**



**IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES DE LA**  
**INTERNALIZACIÓN DE CAVEOLINA-1 INDUCIDA POR**  
**LA PÉRDIDA DE ADHESIÓN CELULAR.**  
**REGULACIÓN POR FILAMINA-A.**

**Doctoranda:**

**Olivia Muriel López**

**Licenciada en Biología**

**Directores:**

**Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso**

**Dr. Asier Echarri Aguirre**

**Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)**



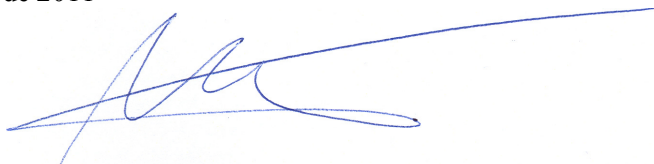


## **CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES DE TESIS**

El Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso y el Dr. Asier Echarri Aguirre CERTIFICAN que la doctoranda Olivia Muriel López ha desarrollado y concluido su trabajo de Tesis Doctoral sobre “IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES DE LA INTERNALIZACIÓN DE CAVEOLINA-1 INDUCIDA POR LA PÉRDIDA DE ADHESIÓN CELULAR. REGULACIÓN POR FILAMINA-A” bajo su supervisión, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, con la financiación de una beca predoctoral concedida por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Ciencia e Innovación).

El Dr. Miguel Quintanilla Ávila, Profesor Honorario del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid, y tutor de la doctoranda, da el visto bueno a la presente Tesis Doctoral.

En Madrid, a 24 de Mayo de 2011

A blue ink signature of Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso, consisting of a series of fluid, overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso  
Jefe de Grupo (Investigador Senior II)  
Laboratorio de Señalización por Integrinas  
Departamento de Biología Vascular e Inflamación  
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

A blue ink signature of Dr. Asier Echarri Aguirre, featuring a stylized 'A' shape with a horizontal line crossing through it.

Dr. Asier Echarri Aguirre  
Investigador  
Laboratorio de Señalización por Integrinas  
Departamento de Biología Vascular e Inflamación  
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

A blue ink signature of Dr. Miguel Quintanilla Ávila, showing a complex, cursive script with multiple loops and a long horizontal tail.

Dr. Miguel Quintanilla Ávila  
Profesor Honorario  
Departamento de Bioquímica  
Universidad Autónoma de Madrid



*Aun pretendiendo nombrar a todas aquellas personas que durante los años de mi Tesis me han dado algún motivo para estarles agradecida, estoy segura de que se me olvidaría alguien. Encuentro, por tanto, necesario hacer un agradecimiento general en el que todas aquellas personas ya quedáis incluidas.*

*Debo agradecer a las personas y/o acontecimientos que, mostrándome diversos aspectos, no siempre positivos, relacionados con la ciencia, la investigación, y las relaciones humanas y laborales, me han hecho aprender, reflexionar y madurar, no sólo como investigadora, sino también como persona.*

*A Miguel Ángel le agradezco la oportunidad que me brindó al permitirme desarrollar esta Tesis en su laboratorio, y en un Centro de Investigación de la calidad del CNIC. Agradezco la confianza que siempre ha tenido en mí y en mis capacidades como investigadora. La madurez científica que he adquirido se la debo a él.*

*Agradezco a Alicia García Arroyo, Juan Miguel Redondo, María Montoya, Juan Serrador y Francisco Sánchez Madrid sus críticas y sugerencias sobre mi trabajo en los seminarios de departamento y en otras ocasiones.*

*A Xosé Bustelo le agradezco el haberme ofrecido la oportunidad de colaborar en los proyectos de Basigina y Coronina.*

*Agradezco Christian Hell su ayuda con el “single-particle tracking”, que me permitió enriquecer en gran medida mi trabajo.*

*A los miembros de las Unidades de Microscopía y Celómica les agradezco la ayuda prestada en numerosas ocasiones, especialmente a Elvira y Raquel por hacerme mucho más entretenidas las horas de confocal y de citómetro, y, con unas buenas risas, ahorrarme varias horas de psicoanálisis...*

*Esther López, María de la Calle, Almudena Fernández y Eduardo Bieger, estoy en deuda con vosotros por tanta ayuda, en tantas ocasiones y siempre con una sonrisa, para resolver tantos asuntos y papeles de los que yo no tengo ni idea...*

*Agradezco, por supuesto, a mis compañeras y compañeros del laboratorio (actuales y pasados) y a las vecinas (y Rubén) del labo de Alicia. Sin duda alguna, el haberos conocido y haber compartido con vosotras/os estos años es lo mejor que me llevo de esta etapa. Gracias por los momentos de risas que hemos compartido, y también por los de llanto; por darme*

*ideas y ayudarme metodológicamente, por vuestro apoyo, comprensión y amistad. Ojala que, allá donde me lleve la vida, encuentre compañeras/os como vosotras/os.*

*Quiero agradecer también a mis amigas Rocío, Marina, Noelia, Sara, Celeste y Mar por ser mi punto de equilibrio con la cordura. Gracias por entenderme, animarme y perdonarme siempre, y por mostrarme y compartir conmigo otras facetas de la vida distintas de los exámenes y los libros. Elena, a ti además tengo que agradecerte el toque artístico que le das a mi vida y el ser tan especial. A todas, gracias, por habernos construido juntas, ha sido la mejor compañía*

*Cómo no, agradezco a mi familia todo lo que me ha dado. Carolina, gracias por ser tan buen ejemplo académico durante toda mi vida. Mami y papi, a vosotros os tengo que agradecer el apoyo y la confianza incondicional que tenéis en mí. Gracias por darme tan buena educación, así como la libertad y el estímulo de ser lo que quiero ser, aún cuando quizás me he equivocado, por no cuestionarme nunca y quererme siempre, pase lo que pase, siempre. Soys el pilar de mi vida y el punto de referencia que me hace volver a la realidad de lo que quiero, cada vez que me alejo demasiado de ello.*

*Leo, a ti tengo que agradecértelo TODO. Gracias por compartir conmigo tantos sueños, y tantos despertares; tantas decisiones; tantas triunfos, y tantos fracasos; tantos clonajes; tanto Billy y tanta Lilly; tantas minipreps; tantas alegrías, y tantas tristezas; tantos miedos; tantas iniciativas, y tantas resignaciones; tantos retos; tantas fantasías, y tantas realidades... **Gracias por ser tal y como eres, y por quererme tal y como soy.***

*A mi padre*  
*A mi madre*  
*A Leo*



*«Allí donde me he equivocado, o donde mi trabajo ha resultado imperfecto, y cuando he sido ardientemente criticado, incluso cuando me han adulado, todo lo cual me mortifica, mi mayor consuelo ha sido decirme a mí mismo miles de veces que “he trabajado tan duramente y tan bien como he sido capaz, y nadie puede hacer más que eso”».*

Charles Darwin, en su autobiografía, 1876.





## **RESUMEN/SUMMARY**

## RESUMEN

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática relativamente estables implicadas en mecanotransducción, compartimentación de señales, metabolismo lipídico y entrada de virus. Están íntimamente asociadas con los filamentos de actina y son internalizadas en respuesta a diferentes estímulos. La pérdida de adhesión celular induce la internalización de caveolas de forma rápida y robusta, así como su tráfico hacia endosomas de reciclaje positivos para Rab11. Sin embargo, las rutas que regulan este proceso no están bien establecidas. La función que el citoesqueleto de actina desempeña en otros procesos de endocitosis sugiere que tanto los filamentos de actina como las proteínas que los regulan pueden tener un papel crucial en la internalización de caveolas tras la pérdida de adhesión celular. En esta Tesis se ha analizado el efecto de varias proteínas candidatas en la regulación de la internalización de caveolas tras la pérdida de adhesión celular. Tras la identificación de varias proteínas cuyos ARNi produjeron bloqueo de la internalización de caveolina-1-GFP en células HeLa, definimos dos rutas, una compuesta por las tirosina quinasas Abl (c-Abl y Arg) y la formina mDia1, y otra compuesta por filamina-A y PKC $\alpha$ . En la primera ruta observamos que la forma activa de mDia1 rescata el defecto en la internalización de caveolas en las células doble KO para c-Abl y Arg. Durante el estudio de la segunda ruta observamos que FLNa es necesaria para mantener la distribución lineal de las vesículas de caveolina-1 sobre las fibras de estrés. El seguimiento de vesículas de Cav1-GFP con alta resolución espacio-temporal mediante microscopía TIRF mostró que FLNa es necesaria para el confinamiento de las vesículas de caveolina-1 en un área reducida, y para su anclaje estable a la membrana plasmática, procesos dependientes del correcto citoesqueleto de actina. Tanto la distribución lineal de las vesículas de caveolina-1 en adhesión como su anclaje a la membrana plasmática son necesarios para la correcta internalización y tráfico de caveolas. El tráfico de caveolina-1 requiere la capacidad de FLNa de unirse a los filamentos de actina así como un ciclo de fosforilación de FLNa en Ser2152 tras la pérdida de adhesión, de forma dependiente de PKC $\alpha$ . Estas dos rutas probablemente regulen conjuntamente la internalización de caveolas tras la pérdida de adhesión celular, indicando la gran complejidad de este proceso altamente dependiente del citoesqueleto de actina.

## SUMMARY

Caveolae are relatively stable membrane invaginations involved in mechanotransduction, signaling, compartmentalization of signaling, lipid metabolism and viral entry. Caveolae are closely associated with actin fibers and can be internalized in response to different stimuli. Loss of cell adhesion induces rapid and robust caveolae internalization and trafficking toward a Rab11-positive recycling endosome; however, pathways governing this process are poorly understood. The role of the actin cytoskeleton in several endocytosis mechanisms suggests that these microfilaments, as well as the proteins regulating actin dynamics can have a crucial role in caveolae endocytosis after loss of cell adhesion. In this Thesis, the effect of several candidate proteins in the regulation of caveolae internalization after loss of cell adhesion has been analyzed. Several proteins whose siRNA blocked caveolina-1-GFP internalization were identified. We defined two pathways, one of them composed by Abl tyrosin kinases (c-Abl and Arg) and formin mDia1, and the other composed by filamin-A and PKC $\alpha$ . In the first pathway, we observed that active mDia1 rescued caveolae endocytosis defect in c-Abl/Arg dKO cells. During the study of the second pathway we observed that FLNa is required to maintain the linear distribution of caveolin-1 vesicles along actin fibers. High spatio-temporal resolution particle tracking of caveolin-1-GFP vesicles by TIRF microscopy revealed that FLNa is required for the actin cytoskeleton-dependent caveolin-1 vesicle arrest in a confined area, and for their stable anchorage at the plasma membrane. Both, linear distribution of caveolin-1 vesicles in adherent cells and their anchorage at the plasma membrane are necessary for correct caveolae internalization and trafficking. Therefore, caveolin-1 trafficking requires both the ability of FLNa to bind actin and PKC $\alpha$ -dependent phosphorylation of FLNa on Ser2152 after cell detachment. Integration of these two pathways is probably required for caveolae internalization after loss of cell adhesión, indicating the big complexity of this actin cytoskeleton-dependent process.



# ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Microdominios de membrana y caveolas.....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Microdominios de membrana .....	6
1.1.2. Caveolas .....	6
1.1.2.1. Caveolinas .....	8
1.1.2.1.1. Caveolina 1 .....	9
1.1.2.2. Cavininas .....	11
<b>1.2. Endocitosis.....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Concepto y tipos de endocitosis.....	12
1.2.2. Endocitosis por caveolas .....	13
1.2.3. Papel de la adhesión celular en la endocitosis por caveolas .....	15
1.2.3.1. Adhesión celular .....	15
1.2.3.2. Principales receptores de matriz extracelular: las integrinas .....	15
1.2.3.4. Endocitosis de caveolas inducida por la pérdida de adhesión celular .....	16
<b>1.3. Citoesqueleto .....</b>	<b>18</b>
1.3.1. Componentes y funciones del citoesqueleto .....	18
1.3.2. Papel del citoesqueleto en la endocitosis por caveolas .....	18
1.3.3. Proteínas de unión a actina .....	19
1.3.3.1. Proteínas nucleadoras y elongadoras de microfilamentos no ramificados .....	19
1.3.3.2. Proteínas iniciadoras de ramificaciones sobre filamentos preexistentes .....	20
1.3.3.3. Proteínas que unen la membrana con dominios de actina .....	20
1.3.3.4. Proteínas que promueven reordenamientos en el citoesqueleto de actina: familia de tirosina quinasas no receptoras (c-Abl y Arg).....	21
1.3.3.5. Proteínas GTPasas pequeñas de la familia Rho .....	21
1.3.3.6. Proteínas que entrecruzan microfilamentos .....	22
<b>1.4. Filaminas .....</b>	<b>22</b>
1.4.1. Conceptos generales sobre la familia de las filaminas .....	22
1.4.2. Filamina-A.....	23
1.4.2.1. Estructura.....	23
1.4.2.2. Funciones biológicas.....	24
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1. Anticuerpos y reactivos.....	30
3.2. ARNch y ARNi.....	30
3.3. Cultivos celulares .....	32
3.4. Plásmidos de expresión en mamíferos .....	33
3.5. Transfección de ADn y ARNi.....	35
3.6. Generación de líneas celulares estables por infección viral .....	35
3.7. Extracción proteica e inmunodetección ( <i>Western blot</i> ) .....	36
3.8. Ensayos de internalización de Cav1 en suspensión y reciclaje tras recuperación de la adhesión .....	37
3.9. Ensayos de cierre de herida <i>in vitro</i> .....	37
3.10. Ensayos de inmunofluorescencia .....	37
3.11. Medida de la endocitosis de CTxB por microscopía.....	38
3.12. Citometría de flujo .....	39
3.13. Ensayos de video-microscopía.....	40

<b>3.14. Análisis del tamaño y movimiento de vesículas de Cav1-GFP en películas de TIRF .....</b>	<b>40</b>
<b>3.15. Análisis de trayectorias de vesículas de Cav1-GFP con alta resolución espacio-temporal.....</b>	<b>41</b>
<b>3.16. Inhibición de la actividad o correcto funcionamiento de proteínas celulares.....</b>	<b>42</b>
<b>3.17. Extracción de ARN, reacción de reversotranscripción y PCR cuantitativa .....</b>	<b>42</b>
<b>3.18. Análisis estadístico .....</b>	<b>43</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Validación del sistema celular HeLa-Cav1-GFP para el estudio de la endocitosis de caveolas en suspensión.....</b>	<b>46</b>
4.1.1. Caveolina-GFP se internaliza en suspensión y se recicla tras recuperación de adhesión.....	46
4.1.2. Alteración de la internalización de Cav1-GFP en células HeLa tras el tratamiento con controles positivos .....	49
<b>4.2. Identificación de reguladores de la internalización de Cav1 mediante abordajes de silenciamiento de proteínas con ARNi .....</b>	<b>51</b>
4.2.1. Estudio de la implicación de proteínas relacionadas con la adhesión celular: integrina- $\beta$ 3, talina-1, FLNa y FLNb .....	51
4.2.2. Estudio de la implicación de proteínas reguladoras de la polimerización de actina-F: N-WASP, CTTN, formina1 Dia1, Dia2, Arp2/3 y Abi1/2 .....	53
4.2.3. Estudio de la implicación de las proteínas quinasas: Src, c-Src tirosina quinasa (Csk), c-Abl/Arg y PAK1 .....	55
4.2.4. Estudio de la implicación de proteínas adaptadoras: Grb10 y CrkII.....	56
4.2.5. Estudio de la implicación de proteínas que regulan la conformación de la MP: FBP17 y SDPR1 .....	57
<b>4.3. Validación de la regulación de la internalización de Cav1 por las proteínas FBP17, Dia1 y cAbl/Arg.....</b>	<b>59</b>
4.3.1. Distribución de Cav1 en respuesta a la sobreexpresión de FBP17 .....	59
4.3.2. Internalización de Cav1 y CTxB en fibroblastos dKO para cAbl y Arg, y reconstituidos .....	60
4.3.3. Rescate de la internalización de Cav1 por Dia1 en las células Abl/Arg dKO .....	61
<b>4.4. Regulación de la internalización de Cav1 por las proteínas FLNa y PKC<math>\alpha</math>.....</b>	<b>63</b>
4.4.1. FLNa y FLNb regulan conjuntamente la internalización de Cav1 .....	63
4.4.1.1. FLNa regula la entrada de CTxB y Tfn en suspensión.....	67
4.4.2. FLNa regula la distribución de Cav1 sobre fibras de estrés en adhesión .....	69
4.4.3. FLNa regula el anclaje de las vesículas de Cav1-GFP a la MP basal .....	73
4.4.4. La unión de FLNa a la actina y su fosforilación en Ser2152 son necesarios para la distribución de Cav1 en células en adhesión .....	77
4.4.5. La unión de FLNa a la actina y su fosforilación en Ser2152 son necesarios para la internalización de Cav1 tras la pérdida de adhesión celular .....	81
4.4.6. Identificación de la proteína quinasa responsable de la fosforilación de FLNa en suspensión.....	83
4.4.7. La GTPasa de unión a FLNa RalA regula la internalización de Cav1 .....	86
4.4.7.1. Papel de RalA G23V en la fosforilación de FLNa en suspensión .....	87
4.4.8. La retención de Cav1 en la MP mediada por FLNa regula el reclutamiento de Rac a la MP y la proliferación celular.....	88
<b>4.5. Regulación de la internalización de transferrina por Cav1 y FLNa en suspensión .....</b>	<b>92</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>109</b>
<b>8. ANEXO I: VIDEO-MICROSCOPIA (CD).....</b>	<b>131</b>
<b>9. ANEXO II: PUBLICACIONES .....</b>	<b>133</b>





## **ABREVIATURAS**

<b>ABD</b>	<i>actin binding domain</i> , <b>dominio de unión a actina</b>
<b>Abi</b>	<i>Abl interactor</i>
<b>ADN</b>	<b>ácido desoxirribonucleico</b>
<b>ARN</b>	<b>ácido ribonucleico</b>
<b>ARNch</b>	<b>ácido ribonucleico corto horquillado</b>
<b>ARNi</b>	<b>ácido ribonucleico de interferencia</b>
<b>ARNm</b>	<b>ácido ribonucleico mensajero</b>
<b>Arp2/3</b>	<i>Actin related protein 2/3</i> , <b>proteína relacionada con la actina 2/3</b>
<b>BAR</b>	<i>Bin/Amphiphysin/Rvs</i>
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i> , <b>albúmina de suero bovino</b>
<b>Cav1</b>	<b>caveolina-1</b>
<b>CCR2B</b>	Chemokine receptor 2B, <b>receptor 2B de quimioquinas.</b>
<b>CEMM</b>	<i>cholesterol-enriched membrane microdomains</i> , <b>microdominios de membrana ricos en colesterol</b>
<b>CHD</b>	<i>calponin homology domain</i> , <b>dominio de homología a calponina</b>
<b>CLIC</b>	<i>clathrin independent carriers</i> , <b>transportadores independientes de clatrina</b>
<b>CMH I</b>	<b>complejo mayor de histocompatibilidad clase I</b>
<b>CSD</b>	<i>caveolin-scaffolding domain</i> , <b>dominio de anclaje de caveolina</b>
<b>CR</b>	<i>colocalization ratio</i> , <b>cociente de colocalización</b>
<b>Csk</b>	<i>C-terminal Src kinase</i> , <b>quinasa de Src en su C-terminal</b>
<b>CTTN</b>	<b>cortactina</b>
<b>CTxB</b>	<i>cholera toxin subunit B</i> , <b>subunidad B de la toxina colérica</b>
<b>CytD</b>	<b>citocalasina D</b>
<b>dKO</b>	<b>doble <i>knock out</i></b>
<b>dNTP</b>	<b>desoxinucleótidos trifosfato</b>
<b>Dyn2</b>	<i>dynammin2</i> , <b>dinamina2</b>
<b>EEA-1</b>	<i>early endosome antigen 1</i> , <b>antígeno 1 del endosoma temprano</b>
<b>eNOS</b>	<i>endothelial nitric oxide sintase</i> , <b>óxido nítrico sintasa endotelial</b>
<b>ERC</b>	<i>endosomal recycling compartment</i> , <b>compartimento endosomal de reciclaje</b>
<b>FAK</b>	<i>focal adhesion kinase</i> , <b>quinasa de adhesión focal</b>
<b>FITC</b>	<i>fluorescein isothiocyanato</i> , <b>iso-tiocianato de fluoresceína</b>
<b>FLNa</b>	<b>filamina-A</b>
<b>FLNb</b>	<b>filamina-B</b>
<b>FN</b>	fibronectina
<b>GAP</b>	<i>GTPase-activating protein</i> , <b>proteína activadora de GTPasa</b>
<b>GDI</b>	<i>GDP-dissociation inhibitor</i> , <b>inhibidor de disociación de GDP</b>

<b>GEEC</b>	<i>GPI-anchored protein enriched early endosomal compartment</i> , <b>proteína anclada a GPI enriquecida en el compartimento endosomal temprano</b>
<b>GM1</b>	<b>gangliósido GM1</b>
<b>GM130</b>	<i>cis-Golgi matrix 130</i> , <b>matriz del cis-Golgi 130</b>
<b>GPCRs</b>	<i>G protein-coupled receptors</i> , <b>receptores acoplados a proteína G</b>
<b>GPI</b>	<i>glycosylphosphatidylinositol</i> , <b>glicosil fosfatidil inositol</b>
<b>GDP</b>	<i>guanosine di-phosphate</i> , <b>guanosín difosfato</b>
<b>GEF</b>	<i>guanosine nucleotide exchange factor</i> , <b>factor de intercambio de nucleótidos de guanosina</b>
<b>Grb</b>	<i>growth factor receptor bound protein</i> , <b>proteína unida a receptor de factor de crecimiento</b>
<b>GTP</b>	<i>guanosine tri-phosphate</i> , <b>guanosín trifosfato</b>
<b>HEPES</b>	<b>ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacina-etanosulfónico</b>
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i> , <b>peroxidasa de rábano</b>
<b>ITGβ3</b>	<b>integrina-β3</b>
<b>KD</b>	<i>Knockdown</i> , <b>silenciamiento</b>
<b>KO</b>	<i>knockout</i>
<b>MEC</b>	<b>matriz extracelular</b>
<b>MEF</b>	<i>mouse embryonic fibroblast</i> , <b>fibroblasto de embrión de ratón</b>
<b>MP</b>	<b>membrana plasmática</b>
<b>MTOC</b>	<i>microtubule organizing center</i> , <b>centro organizador de microtúbulos</b>
<b>MURC</b>	<i>muscle-restricted, coiled-coil protein</i> , <b>proteína con dominios superenrollados específica de músculo. También llamada cavina-4</b>
<b>MW</b>	<i>molecular weight</i> , <b>peso molecular</b>
<b>NPF</b>	<i>Nucleation promoting factor</i> , <b>factor promotor de la nucleación</b>
<b>pb</b>	<b>par de bases</b>
<b>PAK</b>	<i>p21 activated kinase</i> , <b>quinasa activa p21</b>
<b>PEST</b>	<b>secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T).</b>
<b>PKA</b>	<i>protein kinase A</i> , <b>proteína quinasa A</b>
<b>PKC</b>	<i>protein kinase C</i> , <b>proteína quinasa C</b>
<b>MP</b>	<b>membrana plasmática</b>
<b>PTRF</b>	<i>polimerase I and transcript release factor</i> , <b>factor de terminación de la transcripción y la polimerasa I. También llamada cavina-1</b>
<b>RTK</b>	<b>receptor tirosina quinasa</b>
<b>SDPR</b>	<i>serum deprivation protein response</i> , <b>proteína de respuesta a privación de</b>

	<b>suero. También llamada cavina-2</b>
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , <b>dodecil sulfato sódico</b>
<b>SH</b>	<i>src homology</i> , <b>homología con Src</b>
<b>SRBC</b>	<i>sdr-related gene product that binds to C-kinase</i> , <b>producto génico relacionado con Sdr que se une a quinasa C. También llamada cavina-3.</b>
<b>Tfn</b>	<b>transferrina</b>
<b>TIRFm</b>	<i>total internal reflection fluorescence microscopy</i> , <b>microscopía fluorescente de reflexión total interna</b>
<b>TRAF2</b>	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-receptor associated factor 2</i> , <b>factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral <math>\alpha</math></b>
<b>TRITC</b>	<b>tetra-metil-rodamina isotiocianato</b>
<b>u.a.</b>	<b>unidades arbitrarias</b>
<b>N-WASP</b>	<i>Wiskott–Aldrich syndrome protein</i> , <b>proteína del síndrome de Wiskott–Aldrich</b>
<b>WAVE</b>	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i> , <b>proteína homóloga a verplolina de la familia de WASP</b>
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>WGA</b>	<i>wheat germ agglutinin</i> , <b>aglutinina de germen de trigo</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Microdominios de membrana y caveolas

### 1.1.1. Microdominios de membrana

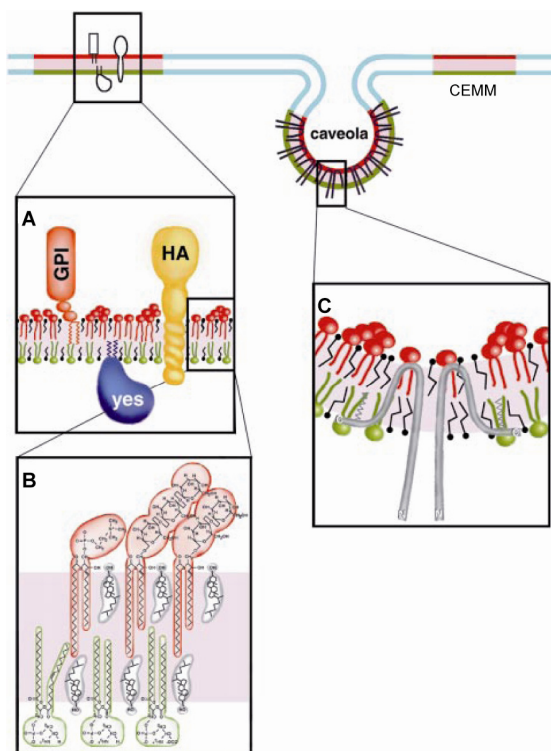
La membrana plasmática es una estructura fundamental para el mantenimiento de la integridad celular ya que permite la compartimentación de las reacciones bioquímicas y sirve de barrera entre el espacio extracelular y el citoplasma. Tradicionalmente se ha explicado su estructura en base al modelo del mosaico fluido (Singer y Nicolson, 1972), según el cual las proteínas, elementos claves para la funcionalidad de la membrana, se mueven libremente por una bicapa lipídica cuya única función sería la de servir de disolvente. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que en la bicapa hay una distribución asimétrica de lípidos en las caras exoplásmica y citoplásmica, y que éstos también se ordenan diferencialmente en la dimensión lateral, contrariamente a lo propuesto en el modelo anterior (Lodish y col., 2003). Esta organización lateral, que incrementa el orden dentro de la membrana, resulta del empaquetamiento preferencial de los esfingolípidos y el colesterol en pequeñas plataformas móviles insertadas en la membrana, y en las que se sitúan proteínas con unas determinadas características físicoquímicas. Se propuso entonces un nuevo modelo de membrana plasmática (Simons e Ikonen, 1997) en el que se describe la organización de estos microdominios lipídicos o “*lipid rafts*”, a los que en esta Tesis nos referiremos como “microdominios de membrana ricos en colesterol” (de sus siglas en inglés, CEMMs). Estos dominios consisten en ensamblajes de esfingolípidos, colesterol y proteínas, que pueden entrar o salir de forma selectiva, y que desempeñan un papel en el tráfico de membrana y en la señalización (Figura 1A,B). Aunque existe un intenso debate acerca de la existencia de los CEMMs en membranas celulares *in vivo*, los avances tecnológicos recientes tales como la microscopía de alta resolución, la lipidómica y los estudios biofísicos parecen apoyar esta teoría (Simons y Gerl, 2010).

Una característica muy importante de los CEMMs es su capacidad de compartimentar procesos celulares, regulando la intensidad de múltiples cascadas de señalización y el tráfico de membrana (Le Roy y Wrana, 2005; Simons y Toomre, 2000). El ensamblaje de los CEMMs ocurre inicialmente en el Golgi ya que, a pesar de que el colesterol se sintetiza en el retículo endoplasmático, los esfingolípidos lo hacen en el primero. Las proteínas asociadas con estos microdominios son: proteínas de anclaje GPI (glicosil fosfatidil inositol), proteínas transmembrana y proteínas aciladas.

### 1.1.2. Caveolas

Las caveolas constituyen otro tipo de microdominio de membrana semejante a los CEMMs en su composición lipídica, pero con la diferencia de que presentan una proteína específica, la caveolina, que les confiere una invaginación característica en forma de letra omega ( $\Omega$ ) (Figura 1C). Fueron identificadas inicialmente mediante microscopía electrónica (Palade,

1953; Yamada, 1955) y constituyen plataformas relativamente estables, pero susceptibles de fisión y fusión con la membrana plasmática en respuesta a determinados estímulos (Anderson, 1998; Parton y Simons, 2007). Aparecen en la mayoría de las células de los vertebrados, siendo especialmente abundantes en adipocitos, células endoteliales, fibroblastos y células de tejido muscular. Recientemente se han identificado otras proteínas formando parte de las caveolas, llamadas cavinas y que tienen función adaptadora (Chidlow y Sessa, 2010).



**Figura 1. Modelo para la organización de los CEMMs y las caveolas.** (A) CEMMs. Contienen proteínas con anclaje GPI en la cara exoplásmica de la bicapa lipídica, proteínas aciladas en la cara citosólica (se ilustra Yes, quinasa de la familia Src) o proteínas con dominios transmembrana fuertemente hidrofóbicos (se ilustra hemaglutinina, HA). (B) La bicapa lipídica en los CEMMs es asimétrica, con esfingomielina (rojo) y glucoesfingolípidos (rojo) enriquecidos en la cara exoplásmica y con glicerolípidos (verde) en la cara citosólica. El colesterol (gris) se presenta en ambas caras y rellena los espacios que quedan bajo las cabezas polares de los lípidos. (C) Caveolas. Se forman por la autoasociación de las moléculas de caveolina-1 induciendo la formación de una invaginación en forma de cueva o  $\Omega$ . Figura adaptada de Simons y col., *Nature*. 1997.

Las caveolas tienen una relevancia funcional en múltiples procesos celulares, entre los que cabe destacar la endocitosis, explicada en el apartado 1.2.2., la transcitosis (Kurzchalia y Parton, 1999; Williams y Lisanti, 2005) y la homeostasis del colesterol (Fu y col., 2004; Razani y col., 2002b; Smart y col., 1996). Asimismo, las caveolas también tienen una importante función reguladora en la transducción de señales debido a que en ellas se localizan diversas moléculas de señalización como receptores tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G, canales iónicos y diversas proteínas adaptadoras y estructurales (Anderson, 1998). Esto ha llevado a proponer que las caveolas actúan como plataformas que integran la regulación de la actividad, localización y/o acoplamiento de dichas moléculas a sus efectores (Anderson, 1998; Drab y col., 2001). De esta forma, mediante la modulación de diversas rutas de señalización, las caveolas contribuyen a la regulación de la polarización y la migración, el ciclo celular, la apoptosis y la transcripción (Del Pozo y Schwartz, 2007; Grande-García y col., 2007; Guan, 2004; Le Roy y Wrana, 2005; Simons y Toomre, 2000). Por otra parte, caveolas pueden ser utilizadas por algunos organismos patógenos para su entrada en la célula (Pelkmans y col., 2001; Shin y col., 2000).

Recientemente está cobrando relevancia la función que las caveolas desarrollan en la mecanotransducción de señales. Un ejemplo es que la exposición crónica a estrés producido por flujo resulta en un aumento del número de caveolas en la membrana plasmática (Boyd y col., 2003; Rizzo y col., 1998) y que estos cambios vienen acompañados por la activación de rutas de señalización específicas implicadas en mecanotransducción (eNOS, MAPK, etc.), así como un incremento en la fosforilación de caveolina-1 (Cav1). Asimismo, se ha establecido una nueva función para las caveolas como mecanorreceptoras y como reservorio fisiológico de membrana que minimiza las variaciones en la tensión de membrana inducidas por estímulos de estrés mecánico (Sinha y col., 2011).

La biología de las caveolas está íntimamente ligada al citoesqueleto de actina (Kanzaki y Pessin, 2002; Rothberg y col., 1992). Se ha propuesto la existencia de una conexión física entre ambas estructuras, (Richter y col., 2008; Stahlhut y van Deurs, 2000), aunque las proteínas responsables de dicha unión aún no han sido identificadas.

#### **1.1.2.1. Caveolinas**

Las caveolinas constituyen el principal componente proteico y estructural de las caveolas. Se han identificado tres miembros dentro de la familia de la caveolinas en vertebrados (Williams y Lisanti, 2004). El gen *Cav1* se compone de tres exones muy conservados en todas las especies que incluye dos isoformas, Cav1- $\alpha$ , predominante y de 178 residuos, y Cav1- $\beta$ , derivada de un segundo codón de iniciación de la traducción en la posición 32 de la secuencia y que consta de 147 residuos (Scherer y col., 1995). *Cav2* codifica una proteína de 149 residuos (Scherer y col., 1996) y se compone también de tres exones. Finalmente, el gen *Cav3* está compuesto por dos exones que codifican una proteína de 151 residuos (Tang y col., 1996). Cav1 y Cav3 presentan una alta homología en su secuencia aminoacídica (Williams y Lisanti, 2004). Mientras que Cav1 y Cav2 se coexpresan en la mayoría de los tejidos (Scherer y col., 1997; Scherer y col., 1996), Cav3 se encuentra exclusivamente en células musculares (Song y col., 1996; Tang y col., 1996). De estas tres proteínas, Cav1 y Cav3 parecen ser las más importantes en la biogénesis de caveolas ya que los tejidos derivados de ratones deficientes en Cav1 carecen de estas estructuras (Drab y col., 2001; Razani y col., 2001) y Cav3 es necesaria para la biogénesis de caveolas en el músculo esquelético y cardíaco (Galbiati y col., 2001). Sin embargo, el papel de Cav2 en la formación de caveolas es menos claro pues no es necesario para la formación de caveolas en el tejido adiposo o en el endotelio pulmonar, pero parece ser un soporte en el ensamblaje de caveolas por medio de su oligomerización con Cav1 (Razani y col., 2002a; Scheiffele y col., 1998). Se ha visto, no obstante, que la sobreexpresión de Cav1 en células endoteliales no conduce a un incremento en el número de caveolas (Bauer y col., 2005) así como que las caveolinas se expresan en tejidos y tipos celulares donde no se forman caveolas como las



neuronas (Hansen y Nichols, 2010), lo que sugiere la existencia de otros componentes estructurales adicionales que constituirían el paso limitante del proceso de formación de caveolas.

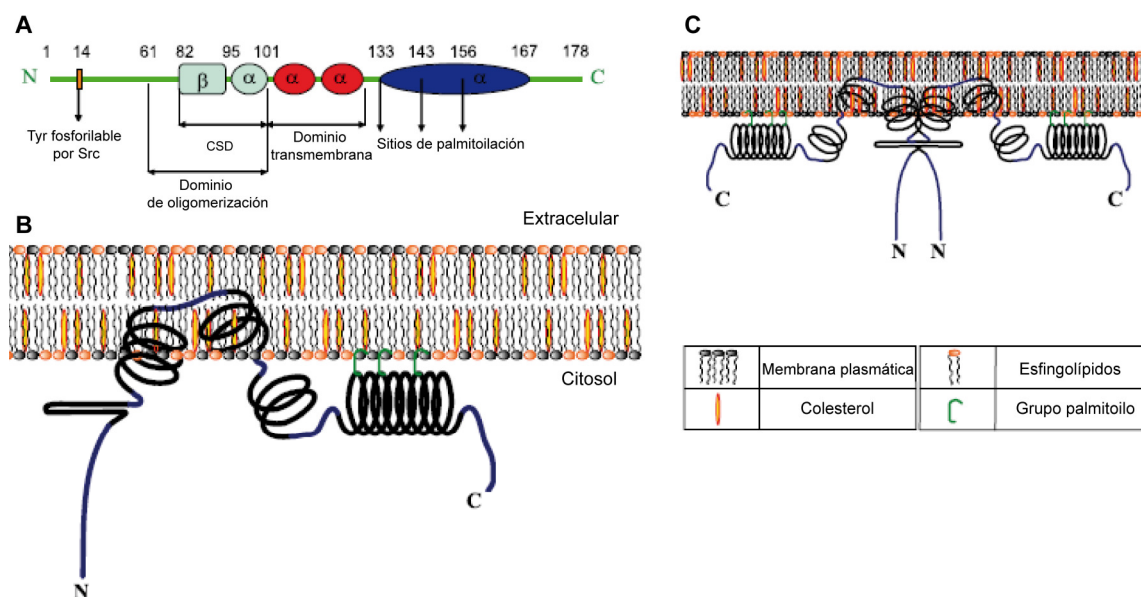
Además de su papel estructural en las caveolas, las caveolinas tienen un papel activo en la modulación de la actividad de proteínas de transducción de señales, ya que pueden servir como plataformas para la compartimentación y concentración de moléculas señalizadoras (Okamoto y col., 1998; Shaul y Anderson, 1998).

Las mutaciones en alguna de las caveolinas se correlacionan con patologías como la distrofia muscular y la lipodistrofia por mutaciones o ausencia de *Cav1* (Hayashi y col., 2009), la distrofia muscular de las cinturas por mutaciones en *Cav3* (Galbiati y col., 1999; Minetti y col., 1998), y cáncer de mama por mutaciones en *Cav1* (Hayashi y col., 2001; Lee y col., 2002).

#### **1.1.2.1.1 Caveolina-1**

Estructuralmente, la Cav1 es una proteína integral de membrana de 22-24 kDa (Spisni y col., 2005) embebida en la monocapa citosólica de las membranas celulares, debido a la presencia de una región central hidrofóbica (residuos 102-122), dejando los dominios N y C-terminal orientados hacia el citosol y, por tanto, accesibles a la interacción con proteínas citosólicas (Dupree y col., 1993; Monier y col., 1995) (Figura 2). Se ha descrito un dominio, entre los residuos 82 y 101, denominado “de anclaje” (CSD, *caveolin-scaffolding domain*) necesario y suficiente para la localización de caveolina en membrana (Schlegel y col., 1999). Este dominio también está implicado en la interacción de Cav1 con proteínas de señalización, como la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y en la unión con moléculas de colesterol (Bernatchez y col., 2005).

Cav1 presenta varias modificaciones postraduccionales como palmitoilación y fosforilación. La palmitoilación de Cav1 en Cys133, Cys143 y Cys156, si bien no es indispensable para la localización de Cav1 en membrana, debido a la presencia de un dominio transmembrana, ejerce un importante papel en la estabilización de su estructura terciaria (Dietzen y col., 1995; Monier y col., 1996) y además contribuyen a la unión de Cav1 al colesterol (Uittenbogaard y Smart, 2000). Los sitios de fosforilación se encuentran en el dominio N-terminal (Tyr14 y Ser80) (Li y col., 1996b; Schlegel y col., 2001). La fosforilación en Ser80 está implicada en la unión de Cav1 a la membrana del retículo endoplásmico y en la regulación de su entrada en la vía secretora (Schlegel y col., 2001). La fosforilación en Tyr14 parece ser crucial para la función reguladora de Cav1 en diversas vías de señalización (Cao y col., 2002; Labrecque y col., 2004) así como para la regulación de la migración direccional (Grande-García y col., 2007) y la endocitosis (del Pozo y col., 2005).



**Figura 2. Estructura de la Cav1. (A) Modelo de los dominios funcionales y estructurales identificados en Cav1.** Las estructuras secundarias en hélice- $\alpha$  y lámina- $\beta$  se han posicionado en base a análisis de predicción de estructura. **(B, C)** Modelos propuestos para la topología de Cav1 en la membrana y su oligomerización (representado como homodímero para facilitar su visualización). Figura adaptada de Spisni y col., *Biochem Biophys Res Commun.* 2005.

La Cav1 puede oligomerizar gracias a la presencia de un dominio de oligomerización (Monier y col., 1995). Esta oligomerización, de unos 14-16 monómeros, comienza en el retículo endoplásmico. Una vez que pasan al aparato de Golgi, los oligómeros de Cav1 pueden interactuar por sus regiones C-terminales para dar lugar a complejos aún mayores, de 100-200 moléculas, que se liberarán a la membrana plasmática (Pelkmans y Zerial, 2005; Tagawa y col., 2005) donde dan forma a las caveolas, no observadas en el Golgi (Mogelsvang y col., 2004). También se han observado hetero-oligómeros de Cav1 y Cav2 de alto peso molecular (Scherer y col., 1997). Sin embargo, Cav2 es incapaz de generar estos complejos en ausencia de Cav1 y depende de Cav1 para su transporte a la membrana plasmática (Mora y col., 1999; Parolini y col., 1999). Cav3 puede formar también grandes complejos oligoméricos de aproximadamente 350-400 kDa. Sus propiedades estructurales son similares a las de Cav1, y puede interactuar con Cav2, aunque no se han descrito complejos de estas proteínas (Das y col., 1999).

Funcionalmente, se ha propuesto que Cav1 actúa como proteína adaptadora en las caveolas, interactuando con otras proteínas, supuestamente, a través de su región CSD y regulando su localización subcelular y su actividad. Entre las proteínas mejor descritas que se asocian a Cav1 se encuentran H-Ras (Li y col., 1996a), la familia de tirosinas quinasas Src (Li y col., 1996a; Song y col., 1997), la subunidad  $\alpha$  de proteínas G heterotriméricas (Li y col., 1995; Song y col., 1997) y la eNOS (Feron y col., 1996; García-Cárdena y col., 1996). En muchas ocasiones, la interacción con el CSD resulta en la inhibición de la señalización como en el caso del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (Couet y col., 1997), Src (Li y col.,

1996a) y eNOS (Razani y col., 2002b; Shaul y Anderson, 1998). Cav1 también es necesaria para la regeneración hepática (Fernandez y col., 2006) y tiene un papel en proliferación celular y crecimiento regulado por anclaje a la MEC (Cerezo y col., 2009; Galbiati y col., 1998) aunque se han descrito efectos contrapuestos en diferentes tejidos (Sunaga y col., 2004). En este sentido, aunque en la mayoría de los tejidos Cav1 se comporta como inhibidor de la proliferación, en algunos tumores de mama, próstata y en las células pequeñas del cáncer de pulmón su expresión es un factor de mal pronóstico (Shatz y Liscovitch, 2008; Goetz y col., *en prensa*). Sin embargo, hasta la fecha no se conocen las razones de estas diferencias entre tejidos.

### 1.1.2.2. Cavininas

Las cavininas constituyen una familia exclusiva de vertebrados formada por cuatro proteínas caveolares con función adaptadora o de soporte (Bastiani y col., 2009; McMahon y col., 2009; Vinten y col., 2005). Están implicadas en la regulación de las caveolas y modulan la organización y la función de las caveolinas mediante el remodelado de la membrana (Chidlow y Sessa, 2010). Como características comunes, las cavininas presentan dominios de dedo de leucina para las interacciones entre proteínas, dominios PEST para la renovación proteica, y motivos de fosforilación. Además, todas se unen a fosfatidilserina y sufren frecuentes modificaciones postraduccionales, como la fosforilación estimulada por insulina (Rahman y Sward, 2009).

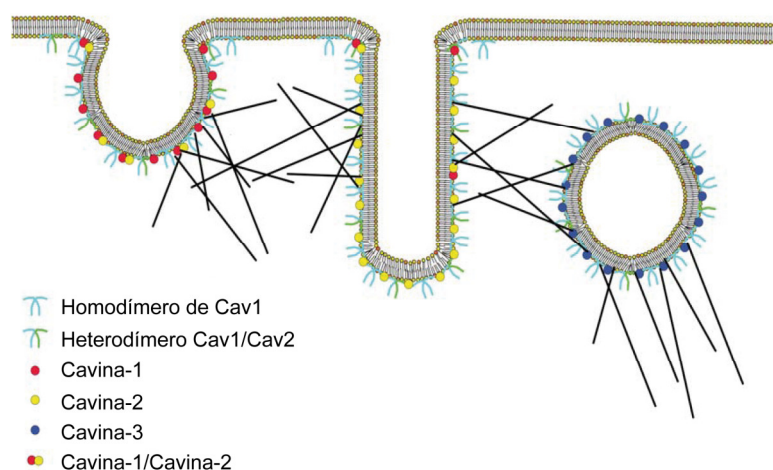
La primera cavina identificada fue cavina-1, también denominada PTRF (*polimerase I and transcript release factor*). Esta cavina es necesaria para la formación y organización de las caveolas (Aboulaich y col., 2004; Liu y col., 2008; Liu y Pilch, 2008). A pesar de que cavina-1 y Cav1 colocalizan en el tejido adiposo y se distribuyen juntas en los CEMMs (Foster y col., 2003; Liu y Pilch, 2008), la interacción entre ambas no parece ser directa (Liu y Pilch, 2008). La ausencia de cavina-1 hace disminuir los niveles celulares de Cav1 (Liu y Pilch, 2008) mediante degradación lisosomal e induce el aumento de su movilidad lateral (Hill y col., 2008).

Cavina-2 o SDPR (*serum deprivation protein response*), también es necesaria para la formación de caveolas (Hansen y col., 2009; Nabi, 2009) y es sustrato de PKC $\alpha$  (*protein kinase C  $\alpha$* ), una proteína con actividad serina quinasa que también se localiza en caveolas (Baig y col., 2009; Gustincich y Schneider, 1993; Mineo y col., 1998). Además, cavina-2 interacciona de forma directa con cavina-1 y es necesaria para mantener los niveles estables de expresión de cavina-1 y Cav1. Su sobreexpresión induce la formación de caveolas elongadas y tubulares, sugiriendo una implicación en la generación de curvatura de membrana (Hansen y col., 2009) (Figura 3).

Cavina-3 o SRBC (*Sdr-related gene product that binds to c-kinase*) participa en la formación de las vesículas caveolares (McMahon y col., 2009) (Figura 3) e interacciona con PKC $\delta$  (*protein kinase C  $\delta$* ) (Izumi y col., 1997; Xu y col., 2001).

Cavina-4 o MURC (*muscle-restricted, coiled-coil protein*) se identificó inicialmente como una proteína citosólica específica de músculo estriado (Bastiani y col., 2009; Ogata y col., 2008; Tagawa y col., 2008), mismo patrón de expresión que Cav3. De hecho, resultados recientes muestran que colocaliza con Cav3 en células musculares (Bastiani y col., 2009).

En la figura 3 se muestra un esquema del papel dinámico de las distintas cavinas en la determinación de la estructura caveolar.



**Figura 3. Papel dinámico de las cavinas en la determinación de la estructura de la caveola.** Cav1 y Cav2 dimerizan para formar el esqueleto de la caveola. Las cavinas, como proteínas de soporte, determinan la forma final de esta estructura. Cavina-1 (rojo) dirige la formación de la forma de cueva de la caveola por sí misma y mediante su interacción con cavina-2 (amarillo). Cuando cavina-2 se expresa a niveles superiores a los de cavina-1 causa la formación de caveolas alargadas. Cavina-3 (azul) dirige la formación de vesículas independientes. Las líneas negras muestran componentes del citoesqueleto que se piensa que median la interacción entre cavinas y caveolinas. Figura adaptada de John H. Chidlow Jr y William C. Sessa, *Cardiovascular Research*. 2010.

## 1.2. Endocitosis

### 1.2.1. Concepto y tipos de endocitosis

Las células de mamíferos han desarrollado diversas y complejas estrategias para internalizar proteínas, y otras macromoléculas de la membrana plasmática y del exterior celular. Estas estrategias se agrupan dentro del proceso conocido como endocitosis. En ella, una pequeña región de la membrana plasmática se invagina hasta fisionarse, produciendo una vesícula independiente. Estas vesículas comienzan un tráfico intracelular en el que cada paso implica un endosoma diferente y que finaliza con el reciclaje de proteínas a la membrana plasmática o con su degradación lisosómica (Lodish y col., 2003). El sistema endocítico de la célula integra gran diversidad de mecanismos coordinados en varias rutas. Puede diferenciarse entre rutas de fagocitosis, macropinocitosis y pinocitosis. Dentro de esta última se encuentra la endocitosis mediada por clatrina, por caveolas/Cav1 o ser independientes tanto de clatrina como de Cav1. Las características principales y mecanismos de regulación de algunas de las rutas endocíticas se exponen en la Tabla I (Doherty y McMahon, 2009). Además de incorporar nutrientes, la

endocitosis ejerce un papel regulador mediante la modulación de la amplitud de diversas vías de señalización al internalizar receptores específicos de la membrana plasmática. Más aún, la endocitosis tiene relevancia en la regulación de la homeostasis de membrana plasmática y en la reposición de proteínas que se localizan en ella (Lodish y col., 2003).

**Tabla I. Características de las principales rutas endocíticas.** Se detalla la morfología, carga implicada, dependencia de proteínas G pequeñas, implicación de dinamina 2 y de otras proteínas para diez de los mecanismos endocíticos más estudiados. Tabla adaptada de Doherty, G. J. & McMahon, H.Y., *Annu Rev Biochem.* 2009.

Mecanismo endocítico	Morfología	Carga implicada	Dependencia de proteína-G	Dependencia de Dyn2	Otras proteínas implicadas
Mediado por clatrina	Vesicular	Toxina de ántrax, receptor de transferrina, RTKs, GPCRs, CTxB	Rab5, Arf6	Sí	Clatrina, AP2, epsina, actina
Dependiente de caveola/caveolina	Vesicular/Tubulovesicular	CTxB, SV40, proteínas unidas a GPI	No claro	Sí	Cavinas, Src, PKC, actina
CLIC/GEEC	Tubular/en forma de anillo	Marcadores de la fase fluida, CTxB, proteínas unidas a GPI	Cdc42, Arf1	No	GRAF1, actina, CD44, disferlina
Ruta IL2R $\beta$	¿Vesicular?	IL2R $\beta$ , FC $\epsilon$ R1, Kir3.4, receptor de citoquina $\gamma$ c	RhoA, Rac1	Sí	PAK1, PAK2
Dependiente de Arf6	Vesicular/tubular	Proteínas del CMH I, CD59, carboxipeptidasE	Arf6	No	No bien definidos
Dependiente de flotilina	Vesicular	CTxB, CD59, proteoglicanos	No bien definido	Sí, aunque no bien definida	Flotilina 1 y 2
Fagocitosis	Con la forma de la carga	Patógenos, restos apoptóticos	Arf6/Cdc42/Rac1/RhoA	Sí	Actina, IQGAP1, proteínas de adhesión
Macropinocitosis	Obdulaciones de membrana	Marcadores de la fase fluida, RTKs	Rac1	No	Actina, PAK1, Ras, PI3K, Src, proteínas BAR
Ondulación circulares de membrana dorsal	Obdulaciones de membrana	Marcadores de la fase fluida, RTKs	No bien definido	Si	Cortactina, actina
Entosis	Con la forma de la célula	Células desligadas de la matriz	RhoA	No	Uniones estrechas

Abreviaturas: CLIC, *clathrin independent carriers* (transportadores dependientes de clatrina); GEEC, *GPI-AP enriched early endosomal compartment* (compartimento endosomal temprano enriquecido en GPI-AP); GPCRs, *G protein-coupled receptors* (receptores acoplados a proteína G); GPI, *glycosylphosphatidylinositol*; CMH I, complejo mayor de histocompatibilidad clase I; RTK, receptor tirosina quinasa.

### 1.2.2. Endocitosis por caveolas

Una de las primeras evidencias de que las caveolas podían ser internalizadas fue señalada por Parton y Simons en 1994, demostrando que las caveolas son estructuras dinámicas que se pueden internalizar mediante un proceso regulado por proteínas quinasa, y de forma dependiente del citoesqueleto de actina (Parton y col., 1994). Estudios posteriores mostraron que las vesículas de Cav1 sufrían movimientos a gran escala, dependientes de microtubulos, hacia un compartimento interno (Conrad y col., 1995; McMahon y col., 2009; Mundy y col., 2002), así como un movimiento especializado de rápido contacto y separación de las vesículas de caveola con la membrana plasmática basal, denominado “*kiss-and-run*” (Pelkmans y Zerial, 2005). Debido a la capacidad de las caveolas para internalizarse, éstas son utilizadas por diversos patógenos como vía de entrada para evitar la degradación lisosómica (Parton y Simons, 2007). La endocitosis de caveolas es crítica para la regulación de múltiples rutas de transducción de señales (Anderson, 1993; Parton y Simons, 2007). La endocitosis de caveolas está regulada por diversas proteínas y estímulos, resumidos en la tabla II, aunque los mecanismos moleculares de esta regulación no están claramente establecidos.

**Tabla II. Agentes reguladores de la endocitosis de caveolas.** Se detalla el tipo de agente regulador y el abordaje experimental usado para su identificación.

Agente regulador	Evidencia experimental	Referencias
Citoesqueleto de actina	La infección de SV40 (por caveolas) se inhibe tras el tratamiento con latruncilina A	(Pelkmans y col., 2002)
	La endocitosis de proteínas ancladas a GPI (caveolas) se inhibe tras el tratamiento con citocalasina D	(Parton y col., 1994)
	La endocitosis de caveolina se estimula tras el tratamiento con citocalasina D	(Kang y col., 2000)
Citoesqueleto de microtúbulos	La endocitosis de caveolina se inhibe tras el tratamiento con nocodazol	(Conrad y col., 1995; Kang y col., 2000; Mundy y col., 2002)
Cambios en la composición lipídica de la membrana	La endocitosis de albúmina (por caveolas) se estimula con la adición de glicosfingolípidos externos así como por el aumento de colesterol y de GM1	(Sharma y col., 2004)
	La infección de SV40 (por caveolas) se inhibe tras el tratamiento con nistatina (secuestrador de colesterol) y Nys-Prog (inhibidor de la síntesis de colesterol)	(Pelkmans y col., 2002)
Actividad quinasa	La endocitosis de proteínas ancladas a GPI (caveolas) se estimula tras el tratamiento con ácido ocaidaico (inhibidor general de fosfatasa) y se inhibe tras el tratamiento con inhibidores de quinasas (estaurosporina)	(Parton y col., 1994)
	La infección de SV40 (por caveolas) se inhibe tras el tratamiento con estaurosporina (inhibidor general de quinasas) o genisteína (inhibidor de Tyr-quinasas) mientras que se estimula tras el tratamiento con ácido ocaidaico (inhibidor general de fosfatasa) y vanadato (inhibidor de Tyr-fosfatasa)	(Pelkmans y col., 2002)
	La infección de SV40 (por caveolas) está regulada por al menos 34 proteínas quinasas	(Pelkmans y col., 2005)
Fosforilación en Tyr14 de Cav1	La endocitosis de caveolas no ocurre en células Cav1 KO que expresan un mutante de Cav1 no fosforilable en Tyr14	(del Pozo y col., 2005)
Estrés oxidativo	La endocitosis de caveolas se estimula tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno	(Kang y col., 2000)
Estrés hiperosmótico	La endocitosis de caveolas se estimula tras el tratamiento con 6mM de sorbitol (choque hiperosmótico)	(Kang y col., 2000)
Estrés térmico	La endocitosis de caveolina se estimula tras el choque térmico a 43°C	(Kang y col., 2000)
Pérdida de adhesión celular al sustrato	La endocitosis de Cav1 se estimula por la pérdida de adhesión celular	(del Pozo y col., 2005)
Dinamina-2	La internalización de toxina colérica (caveolas) se inhibe al bloquear la actividad de dinamina-2 mediante anticuerpos específicos	(Henley y col., 1998)
	La infección de SV40 (por caveolas) se inhibe tras la expresión de la forma mutante de Dyn2 (K44A) que actúa como dominante negativo	(Pelkmans y col., 2002)
	La endocitosis de Cav1 tras la pérdida de adhesión celular se inhibe por la expresión de Dyn2-K44A	(del Pozo y col., 2005)
	La endocitosis de albúmina (por caveolas) se inhibe tras la expresión de una forma mutante de dinamina-2 no fosforilable (Dyn2-Y231F/Y597F)	(Shajahan y col., 2004)
RhoG	La internalización de caveolas se ve alterada por la forma constitutivamente activa de RhoG (RhoG <sup>Q61L</sup> )	(Prieto-Sánchez y col., 2006)
Src	La endocitosis de albúmina (por caveolas) se inhibe tras el tratamiento con inhibidores de Src (PP2 y herbimicina)	(Sharma y col., 2004)
	La endocitosis de gp60 (receptor de albúmina localizado en caveolas) se inhibe tras la expresión de la forma mutante de Src (Y527F, K295M) que actúa como dominante negativo	(Minshall y col., 2000)
PKCα	La endocitosis de caveolas se inhibe tras el tratamiento con inhibidores peptídicos específicos de PKCα	(Smart y col., 1995)
	La endocitosis de proteínas ancladas a GPI (caveolas) no se estimula tras la activación de PKCα	(Parton y col., 1994)
Intersectina	Intersectina, GEF de Cdc42, se localiza en el cuello de la caveola interactuando con dinamina-2, sugiriendo su implicación en el proceso de la fisión	(Predescu y col., 2003)
Mitosis	La endocitosis de caveolas se estimula durante la mitosis	(Boucrot y col., 2011)

La Tyr14 de Cav1 se fosforila por varias proteínas tirosina quinasa como c-Abl (Sanguinetti y Mastick, 2003), Src (Glenney, 1989; Li y col., 1996b) y Fyn (Sanguinetti y col., 2003), mientras que su defosforilación está mediada por la fosfatasa PTP1b (Lee y col., 2006).



Por otro lado, se conocen varias proteínas cuya unión a Cav1 es dependiente de la fosforilación de ésta en Tyr14. Estas proteínas son Csk (*C-terminal Src kinase*), TRAF2 (*tumor necrosis factor- $\alpha$ -receptor associates factor 2*) y Ggrb7 (*growth Factor Receptor Bound Protein 7*) (Cao y col., 2002; Lee y col., 2000). El hecho de que esta fosforilación es necesaria para la internalización de caveolas (del Pozo y col., 2005) (Tabla II) sugiere un potencial papel de estas proteínas en la regulación del proceso.

Si bien la función de la endocitosis de caveolas no está claramente establecida, se ha descrito un papel en el tráfico de lípidos, en la homeostasis de colesterol y en la internalización de receptores (Echarri y col., 2007; Nichols, 2003). Además, se han identificado diversos organismos patógenos que entran en las células mediante esta vía, como *Streptococcus* (Almeida y col., 2010; Benga y col., 2004), SV40 o virus del poliovirus (Pelkmans y Helenius, 2002). Además, algunos estudios sugieren que el tráfico de caveolas regula la transcitosis de albúmina (Minshall y col., 2000).

### **1.2.3. Papel de la adhesión celular en la endocitosis por caveolas**

#### **1.2.3.1. Adhesión celular**

La adhesión celular a la matriz extracelular es un requisito imprescindible para la vida celular, excepto para las células que constituyen las capas superiores de los tejidos epiteliales pluriestratificados y las células sanguíneas (Wheater y col., 1987). Sin embargo, la pérdida transitoria de adhesión celular es un fenómeno que ocurre en la célula en condiciones fisiológicas concretas, así como en condiciones patológicas. Fisiológicamente puede resaltarse la pérdida de adhesión de forma localizada en determinadas regiones de la célula durante la mitosis, y en la migración celular, concretamente en la región posterior de la célula. Por otra parte, la pérdida de adhesión patológica tiene lugar principalmente durante la metástasis. En este sentido, gran cantidad de células tumorales pierden la adhesión celular durante la intravasación, pero sólo aquellas capaces de proliferar en suspensión en el torrente sanguíneo conseguirán sobrevivir, realizar la extravasación y establecer un nuevo foco metastático (Weber, 2007).

#### **1.2.3.2. Principales receptores de matriz extracelular: las integrinas**

De entre las moléculas implicadas en la adhesión celular destacan las integrinas, principales receptores de la matriz extracelular. Las integrinas también están implicadas en muchos otros procesos biológicos como las uniones intercelulares, la migración, la proliferación y la supervivencia. Estas proteínas son heterodímeros compuestos por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ . Las integrinas se agregan tras su activación y/o la unión de sus ligandos, lo que conduce al reclutamiento de moléculas señalizadoras y filamentos de actina hacia la cola citosólica de las integrinas (Hynes, 2002). Este evento desencadena múltiples cascadas de señalización que resultan

en cambios de polaridad celular, progresión del ciclo celular, expresión génica y supervivencia. Algunas de estas proteínas son talina, filamina y FAK (Echarri y col., 2007). La activación de las integrinas es necesaria para el acoplamiento de los receptores de factores de crecimiento a sus efectores (Yamada y Even-Ram, 2002) y para la regulación de muchas moléculas señalizadoras como Erk, PI3K, FAK, tirosinas quinasas de la familia Src y pequeñas GTPasas de la familia Rho, como Rac, Rho y Cdc42 (Assoian y Schwartz, 2001; Yamada y Even-Ram, 2002). En el caso de estas últimas, las integrinas no sólo regulan su actividad, sino también su localización en los CEMMs donde se unen a efectores específicos para iniciar su señalización (Cheng y col., 2006; del Pozo y col., 2004; del Pozo y col., 2002; del Pozo y col., 2000; Palazzo y col., 2004; Ren y col., 2004). Se sabe también que la forma en que las integrinas controlan la unión de estas GTPasas a la membrana plasmática es mediante la regulación de la internalización de esos sitios de unión en la membrana (del Pozo y col., 2004).

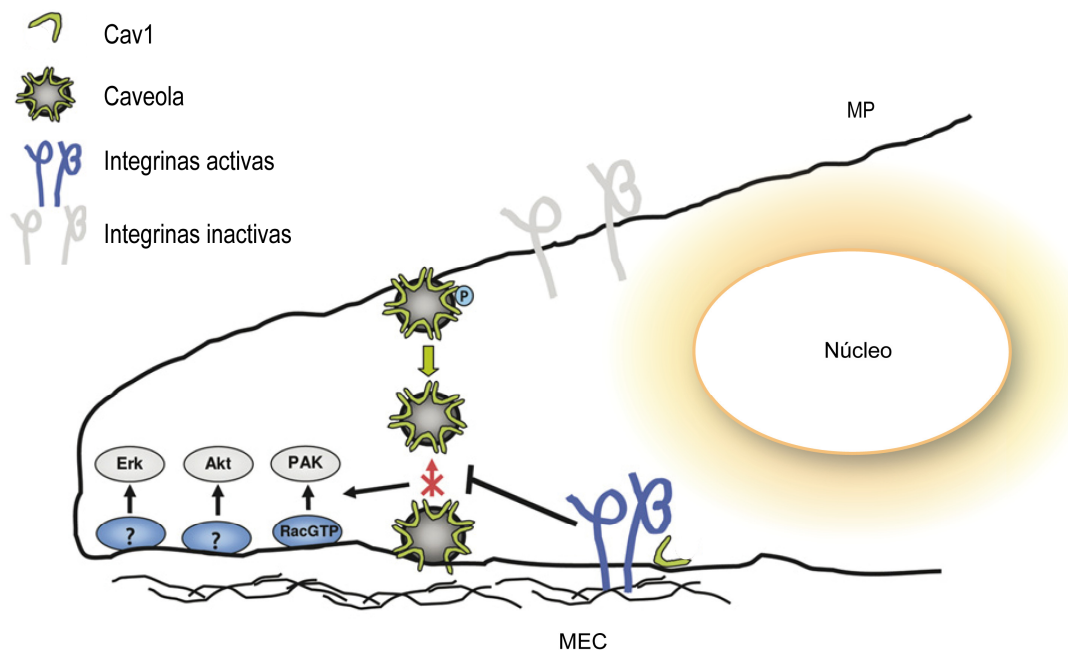
### **1.2.3.3. Endocitosis de caveolas inducida por la pérdida de adhesión celular**

La pérdida de adhesión celular se ha establecido como modelo de estudio de los procesos de endocitosis mediados por caveolas (del Pozo y col., 2005). La función fisiológica de la internalización en suspensión queda de manifiesto en la migración celular, durante la cual la internalización de caveolas en la parte posterior de la célula, temporalmente separada de la MEC, regula la localización de Rac1 (Grande-García y col., 2007) (Goetz y col., *en prensa*). Se ha observado también que, en las situaciones en que la internalización de caveolas se ve alterada, las rutas de señalización activas conducen a la adquisición, por parte de la célula no adherente de una serie de funciones propias de su estado de adhesión, induciéndola a proliferar y a presentar un crecimiento celular independiente de anclaje a la MEC (Cerezo y col., 2009), lo que podría conducir a una diseminación celular por el flujo sanguíneo y al establecimiento de un foco metastásico en algún tejido diferente del de origen.

De esta forma, los avances producidos en los últimos años en el conocimiento de estos procesos han convergido en la elaboración de un modelo para la internalización de caveolas inducida por la pérdida de adhesión celular (Echarri y Del Pozo, 2006; Echarri y col., 2007) (Figura 4). Según este modelo, en células adherentes, las señales de las integrinas impiden la internalización de las caveolas. Esta situación permite que las proteínas señalizadoras puedan unirse a sus sitios de unión en la membrana plasmática y activen diversas rutas de transducción de señales. Por el contrario, en áreas de la célula donde se produce la pérdida de adhesión, las colas citoplasmáticas de las integrinas se desacoplan de la maquinaria señalizadora y se induce la internalización de caveolas, lo que resulta en el desacoplamiento de los complejos de transducción de señal de la membrana de sus efectores bloqueándose la transducción de dichas señales. Mientras que las células normales requieren señales mediadas por la interacción de las integrinas y la matriz extracelular para proliferar, las células tumorales escapan de este



requerimiento y proliferan de forma independiente de adhesión. En este sentido, el presente modelo sugiere que la señalización celular se incrementaría en respuesta a la inhibición de la internalización de caveolas, pudiendo contribuir a la proliferación celular en ausencia de sustrato. Algunas de las rutas de señalización reguladas por la adhesión mediante integrinas, y que se encuentran frecuentemente alteradas en condiciones tumorales, son Ras-Erk y PI3K-Akt. Estas rutas son también reguladas por Cav1, y se encuentran activadas en células Cav1 KO en suspensión (del Pozo y col., 2005).



**Figura 4. Modelo propuesto para la internalización de caveolas regulada por la pérdida de adhesión celular.** En las áreas celulares adheridas a la MEC, las integrinas activas impiden la internalización de caveolas. Esta situación permite el acoplamiento de las proteínas de membrana plasmática a sus efectores (PAK1, Akt, Erk, etc.). En las áreas celulares no adheridas, las integrinas no están activas por lo que la Cav1 se distribuye en las caveolas induciendo su internalización con el consiguiente desacoplamiento entre las proteínas de membrana y sus efectores, lo que conduce a la modulación negativa de sus rutas de señalización. Figura adaptada de Echarri y col., *Semin Cell Dev Biol.* 2007.

Sin embargo, si bien la pérdida de función de Cav1 está implicada en la evasión del control por integrinas (Cerezo y col., 2009), los mecanismos por los que las células tumorales evitan esta regulación no está totalmente clara. En este contexto, el descubrimiento de las rutas que regulan la internalización de caveolas dependiente de integrinas podría identificar nuevos mecanismos moleculares implicados en la proliferación y la migración celular y podrían identificar dianas potenciales para la intervención terapéutica.

## 1.3. Citoesqueleto

### 1.3.1. Componentes y funciones del citoesqueleto

En metazoos el citoesqueleto está formado por filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. La polimerización de actina participa en diversos procesos celulares tales como la citocinesis, transporte de orgánulos, motilidad y adhesión celular, endocitosis y tráfico de membranas. Todos estos procesos implican rápidos ciclos de polimerización y despolimerización de actina con una gran precisión espacio-temporal. Concretamente, el papel del citoesqueleto de actina en los procesos de endocitosis está bien establecido, y se ha propuesto que acumulaciones transitorias de actina por debajo de la membrana plasmática proporcionarían la fuerza necesaria para formar y endocitar las vesículas de la membrana plasmática (Pollard y Cooper, 2009).

### 1.3.2. Papel del citoesqueleto en la endocitosis por caveolas

Tanto los filamentos de actina como los microtúbulos están íntimamente ligados a la biología de las caveolas. Las invaginaciones de caveolas se detectan próximas a haces de actina, por microscopía electrónica y confocal, en distintos tipos celulares (Kanzaki y Pessin, 2002; Rothberg y col., 1992). Por otro lado, Cav1-GFP colocaliza parcialmente con fibras de estrés en células CHO (*Chinese hamster ovary*) (Mundy y col., 2002) y la organización de las caveolas está regulada por las fibras de estrés inducidas por RhoA (Stahlhut y van Deurs, 2000). Ya que ninguno de los componentes proteicos de las caveolas, identificados hasta el momento, interacciona de forma directa con la actina, es de suponer que alguna otra proteína actúa como conector físico entre ambas estructuras celulares. En este sentido, filamina A (FLNa) podría ser un candidato interesante a cumplir esta función, al haberse descrito la interacción de ésta tanto con Cav1 (Stahlhut y van Deurs, 2000) como con la actina filamentosa (Wang y Singer, 1977).

Sin embargo, aún existe controversia respecto al papel exacto del citoesqueleto de actina en la internalización de caveolas. Por una parte, cuando se impide la polimerización de actina con distintos inhibidores como latrunculina A (LatA) (Mundy y col., 2002; Tagawa y col., 2005) o citocalasina D (CytD) (Kang y col., 2000) se produce una acumulación citosólica de Cav1, lo que ha llevado a proponer que la actina cortical inhibiría la internalización de las vesículas caveolares. Por otro lado, otros estudios, también con CytD, obtuvieron el resultado contrario por lo que han propuesto que la internalización de caveolas requiere un citoesqueleto de actina intacto para los primeros pasos de desplazamiento de las vesículas hacia el interior celular (Balasubramanian y col., 2007; Parton y col., 1994).

Con respecto a los microtúbulos, existe un consenso respecto a su papel en el tráfico de caveolas, habiéndose demostrado que la internalización y acumulación de las caveolas y la caveolina cerca del centro organizador de microtúbulos o del aparato de Golgi es dependiente de

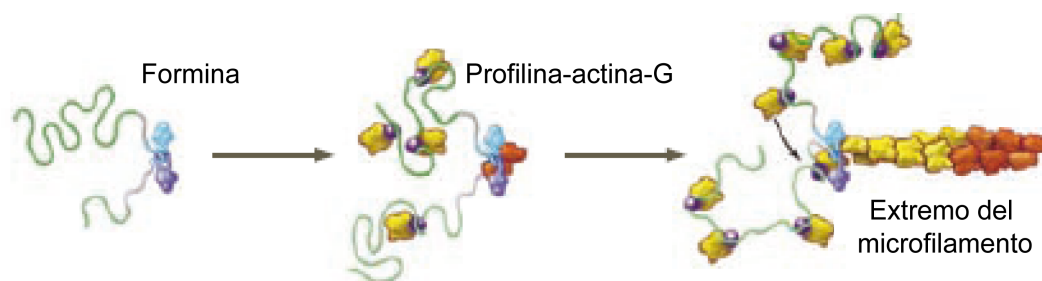
microtúbulos intactos (Conrad y col., 1995; Mundy y col., 2002; Parton y col., 1994; Tagawa y col., 2005). No obstante, las proteínas que median la unión de las caveolas a los microtúbulos no han sido identificadas hasta el momento.

### 1.3.3. Proteínas de unión a actina

Las células eucariotas utilizan más de 100 proteínas accesorias relacionadas con la actina que se encargan de: mantener un reservorio de monómeros de actina, iniciar la polimerización, restringir la longitud de los filamentos, regular el ensamblaje y la renovación de los filamentos de actina, y regular el entrecruzamiento de filamentos en redes. Entre las proteínas de unión a actina podemos distinguir las que se unen a actina globular (actina-G) y las que se unen a actina filamentosa (actina-F). Las primeras desempeñan un papel muy importante en el control del reservorio de actina despolimerizada en las células, siendo algunos miembros de este grupo: profilina, ADF/cofilina y T $\beta$ 4 (*WH2-related protein Thymosin-beta-4*) (Lee y Domínguez, 2010). De entre las proteínas que se unen a actina-F destacan aquellas que elongan filamentos preformados, las que inician ramificaciones, las que entrecruzan filamentos y las que conectan la membrana con regiones ricas en actina. Por su relevancia en esta Tesis, se destacarán también, dentro de este grupo, proteínas que promueven reordenamientos en el citoesqueleto de actina, concretamente las proteínas no receptoras tirosina quinasas Abl, y las proteínas GTPasas de la familia Rho.

#### 1.3.3.1. Proteínas nucleadoras y elongadoras de microfilamentos no ramificados

En este grupo se incluyen las forminas, siendo la subfamilia de *Diaphanous* (mDia1, 2 y 3 de mamíferos y Bni1p de levaduras) la más estudiada. Las forminas son homodímeros que poseen varios dominios, destacando el dominio FH2 (*formin homology 2*), dedicados a la regulación, dimerización, nucleación/elongación de actina y a la autoinhibición (Castrillon y Wasserman, 1994; Zigmond, 2004). Las forminas se asocian con gran afinidad y de forma muy estable a los extremos de los filamentos en crecimiento proporcionándoles anclaje y protegiéndolos de la unión de proteínas que bloquean la elongación (Pollard, 2007) (Figura 5).

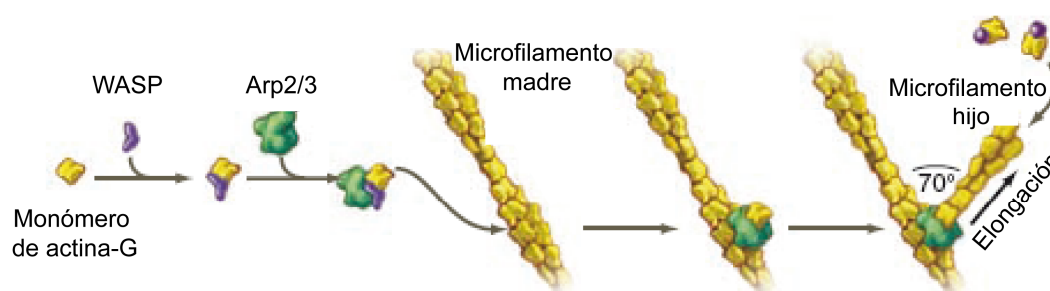


**Figura 5. Nucleación y elongación por las forminas.** Las forminas inician la polimerización a partir de monómeros de actina-G y se mantienen asociadas al extremo en crecimiento. Los complejos profilina-actina-G se unen a la formina y transfieren el monómero de actina al extremo del microfilamento en crecimiento. Figura adaptada de Pollard y col., *Science*. 2009.

Participan en diversas funciones celulares mediante la elongación de los filopodios, de las fibras de estrés y de los filamentos que conforman el anillo contráctil requerido en la citocinesis (Waller y Alberts, 2003).

### 1.3.3.2. Proteínas iniciadoras de ramificaciones sobre filamentos preexistentes

En este grupo se encuentran el complejo Arp2/3, que consta de 7 subunidades. Por sí mismo, el complejo tiene una actividad de nucleación de actina muy baja, pero es activada por miembros de la familia de los factores promotores de la nucleación (NPF) como N-WASP y WAVE. Estos NPF son regulados, entre otras, por las proteínas Abi (Innocenti y col., 2005; Innocenti y col., 2004), que forman un complejo con WAVE. Estas proteínas generan una red de filamentos de actina ramificados que empujan la membrana formando un lamelipodio esencial durante la migración celular (Pollard, 2007) y desempeñan un papel en la endocitosis mediada por clatrina (Boyle y col., 2007; Burton y col., 2005; Dai y Pendergast, 1995; Innocenti y col., 2005; Leng y col., 2005; Lommel y col., 2001) (Figura 6).



**Figura 6. Nucleación por el complejo Arp2/3.** Los factores promotores de la nucleación como WASP se unen a los monómeros de actina y al complejo Arp2/3. La unión a un extremo del microfilamento madre completa la activación, permitiendo el crecimiento de un filamento hijo. Figura adaptada de Pollard y col., *Science*. 2009.

Otra proteína que potencia la actividad del complejo Arp2/3 es cortactina (CTTN), una proteína filamentosa de unión a actina-F y que además es sustrato de Src. Desempeña una función crucial en la coordinación de la dinámica de membrana con el remodelado del citoesqueleto de actina (Cosen-Binker y Kapus, 2006).

### 1.3.3.3. Proteínas que unen la membrana con dominios de actina

Este grupo está referido a las proteínas con dominio BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) que, sin estar relacionadas filogenéticamente, se aúnan en este grupo debido a la presencia del dominio BAR, a su organización modular y al hecho de que frecuentemente se unen al citoesqueleto de actina bajo el control de las GTPasas de la familia Rho (Lee y Dominguez, 2010; Scita y col., 2008). El dominio BAR consiste en un dímero alargado y antiparalelo de dos hélices alfa curvadas (Figura 7). Variaciones significativas en la forma y curvatura del dominio BAR hace que las proteínas BAR se subdividan en 3 subfamilias: N-BAR, F-BAR e I-BAR.

Evidencias recientes de microscopía electrónica sugieren que algunos dominios BAR cooperan en la unión a regiones planas de la membrana induciendo su curvatura, que resulta en la generación de una vesícula endocítica (Frost y col., 2008). De hecho algunas proteínas F-BAR, como FBP17, sindaptina y Toca1 están implicadas en la endocitosis mediada por clatrina en cooperación con dinamina (Ho y col., 2004). Los tipos de dominios y las interacciones entre ellos así como la forma específica del dominio BAR, determinan la función, localización y tipo de estructura de membrana (protrusión, invaginación, túbulo, vesícula) asociado con cada proteína BAR (Lee y Domínguez, 2010).



**Figura 7. Dominio BAR.** El dominio BAR consiste en un dímero antiparalelo elongado y curvado. Figura adaptada de Lee y Domínguez, *Mol Cells*. 2010.

#### **1.3.3.4. Proteínas que promueven reordenamientos en el citoesqueleto de actina: familia de tirosina quinasas no receptoras Abl**

La familia Abl de proteínas tirosina quinasas no receptoras incluye, en mamíferos, las proteínas c-Abl y Arg (*Abl-related gene*). Estas proteínas traducen la información de factores de crecimiento y receptores de adhesión localizados en la superficie celular en cambios en la estructura del citoesqueleto. Tienen estructura y secuencia muy conservadas, con los dominios SH3 (*Src homology 3*), SH2 (*Src homology 2*) y tirosina quinasa (Hernández y col., 2004). Tras el dominio con actividad quinasa hay tres motivos conservados Pro-X-X-Pro para los que se unen otras proteínas con dominios SH3 (Pendergast, 2002). Tanto c-Abl como Arg poseen dominios de unión a actina-F en su C-terminal (Van Etten y col., 1994; Wang y col., 2001). Además de su localización citoplasmática, c-Abl también puede localizarse en el núcleo (Taagepera y col., 1998) al contener secuencias de localización y exportación nuclear.

La regulación de los reordenamientos del citoesqueleto llevada a cabo por estas quinasas implica distintos mecanismos como la regulación de la actividad de proteínas con actividad GTPasa de la familia Rho, fosforilación de la proteína adaptadora CrkII en su Y221, lo que resulta importante para la migración celular, la interacción con las proteínas de la familia Abi (1 y 2), su capacidad de fosforilar y regular a N-WASP, WAVE y CTTN (Bradley y Koleske, 2009), y su unión directa al citoesqueleto (Hernández y col., 2004).

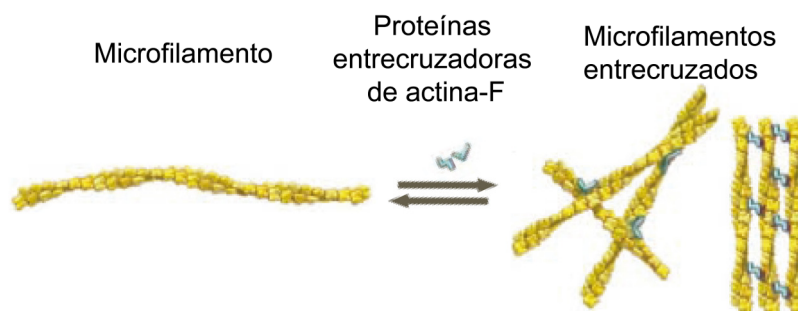
#### **1.3.3.5. Proteínas GTPasas pequeñas de las familias Rho**

Entre las proteínas de la familia de las pequeñas Rho GTPasas, los miembros de mayor importancia en la regulación del ensamblaje del citoesqueleto de actina son Cdc42, Rac y Rho, que controlan la formación de filopodios, lamelipodios y fibras de estrés respectivamente. Estas proteínas, capaces de unir nucleótidos de guanina (GDP y GTP), así como de hidrolizar GTP en

GDP, transmiten señales que conducen al ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto de actina en áreas localizadas (Lee y Domínguez, 2010).

### 1.3.3.6. Proteínas que entrecruzan microfilamentos

En este grupo se incluye la familia de las espectrinas ( $\alpha$ -actinina, espectrina y distrofina) y las filaminas (A, B y C). Suelen estar localizadas en el citoesqueleto cortical próximo a la membrana plasmática, y funcionan conectando las redes de actina (Figura 8) con las proteínas de la matriz extracelular (anquirina, laminina y distroglucanos) (Lee y Domínguez, 2010).



**Figura 8. Entrecruzamiento de microfilamentos.** Las proteínas entrecruzadoras de actina ensamblan microfilamentos formando redes. Figura adaptada de Pollard y col., *Science*. 2009.

## 1.4. Filaminas

### 1.4.1. Conceptos generales sobre la familia de las filaminas

Las filaminas constituyen una de las familias más importantes de proteínas que entrecruzan filamentos de actina. En mamíferos las filaminas forman una familia de proteínas diméricas de alto peso molecular compuesta por tres miembros (filamina-A, B y C) codificados por 3 genes diferentes con una homología de secuencia altamente conservada, y que se expresan de forma ubicua durante el desarrollo embrionario (Sheen y col., 2002; Thompson y col., 2000). En el adulto, filamina-A (FLNa) es la más abundante y ampliamente expresada (Stossel y col., 2001) y consta de dos modalidades resultantes del procesamiento alternativo de su ARNm, la isoforma 1 y la 2, siendo la primera el transcrito predominante que codifica una isoforma ligeramente más corta debido a la ausencia del exón 30 (Maestrini y col., 1993). La filamina-B (FLNb) también se expresa en todos los tipos celulares en el adulto y trabaja en coordinación con FLNa (Sheen y col., 2002). Por el contrario, FLNc tiene expresión restringida a las células del músculo estriado (Sheen y col., 2002; Thompson y col., 2000).

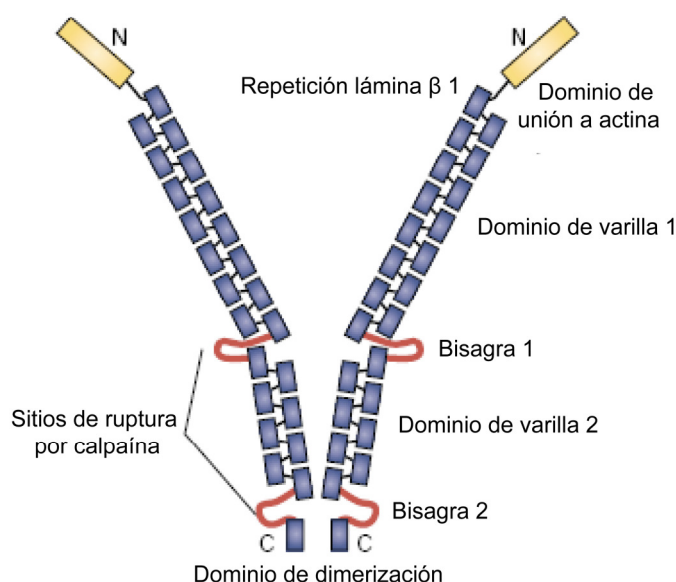
Además de su papel regulador de las redes tridimensionales de actina, las filaminas tienen una importante función en la transducción de señales (van der Flier y Sonnenberg, 2001). Evidencias genéticas sugieren que las filaminas son esenciales para el desarrollo humano y que mutaciones en FLNa y FLNb se asocian con enfermedades genéticas humanas y con un

desarrollo anormal del sistema nervioso central, del tejido óseo, del sistema cardiovascular y de diversos órganos (Feng y Walsh, 2004; van der Flier y Sonnenberg, 2001).

## 1.4.2. Filamina A

### 1.4.2.1. Estructura

Estructuralmente la FLNa es una proteína dimérica de 280 kDa cada monómero. La cadena polipeptídica está formada por un dominio de unión a actina (ABD) en el extremo N-terminal y un dominio largo de “varilla” con 24 repeticiones de ~96 aminoácidos cada una y dispuestos en estructura de láminas  $\beta$  antiparalelas (semejantes a los dominios de inmunoglobulina), interrumpido por dos curvas flexibles de 30-35 aminoácidos con función de bisagra, y que presenta gran divergencia con las de las otras filaminas (Gorlin y col., 1990). La región bisagra 2, entre las repeticiones 23 y 24, es común al resto de filaminas de vertebrados mientras que la región bisagra 1, entre las repeticiones 15 y 16, es específica de FLNa (Gorlin y col., 1990; Stossel y col., 2001) (Figura 9).



**Figura 9. Estructura de la FLNa humana.** Dominio de unión a actina en el N-terminal. El resto de la proteína consta de 24 repeticiones plegadas en láminas  $\beta$  antiparalelas. La dimerización ocurre a través de las repeticiones 24. Contiene dos regiones bisagra (1 y 2). Figura adaptada de Stossel, T.P. y col., *Nature*. 2001.

La dimerización ocurre a través de las repeticiones del C-terminal permitiendo la formación de la estructura flexible en forma de “V” esencial para la función de la proteína (Hock y col., 1990). El ABD consta de dos dominios homólogos de calponina dispuestos en tándem (CHD1 y CHD2), y bastante parecidos a los ABD de otras proteínas entrecruzadoras de actina-F de la familia de las espectrinas. Este dominio permite a la filamina unirse a la actina para inducir la formación de las redes tridimensionales de actina (Brotschi y col., 1978; Janmey y col., 1990; Stossel y Hartwig, 1975). Por su extremo C-terminal, FLNa interacciona con múltiples proteínas (Apartado 1.4.1.2., Tabla III).



FLNa se degrada fácilmente por proteólisis. Se han identificado dos sitios de ruptura por calpaína, uno en la región bisagra 1 y otro en la región bisagra 2. La ruptura por este último sitio genera un fragmento de 240 kDa en el N-terminal y otro de 10 kDa hacia el C-terminal inhabilitando a la proteína para seguir realizando su función de entrecruzar filamentos de actina (Davies y col., 1978; Gorlin y col., 1990)

FLNa presenta un sitio consenso de fosforilación muy conservado en serina 2152 (van der Flier y Sonnenberg, 2001). Este residuo es fosforilado por diversas proteínas serina/treonina quinasas, incluyendo PAK1 (Vadlamudi y col., 2002), PKA (Jay y col., 2004), Akt (Ravid y col., 2008) y p90 RSK2 (Woo y col., 2004). CaM-kinase II (Ohta y Hartwig, 1995) y PKC $\alpha$  (Tigges y col., 2003) también fosforilan FLNa in vitro, aunque el residuo fosforilado no se ha identificado aún. La fosforilación de FLNa influye en su interacción con diversas proteínas, incluyendo sus capacidades de unir actina y de formar redes tridimensionales de ésta (van der Flier y Sonnenberg, 2001). Además, la fosforilación de FLNa previene su ruptura por calpaína (Chen y Stracher, 1989) y regula la formación de ondulaciones de membrana mediados por PAK1 (Vadlamudi y col., 2002). La migración inducida por EGF de las células de melanoma humanas también es regulada mediante la fosforilación de FLNa por p90 RSK2 (Woo y col., 2004).

#### **1.4.2.2. Funciones biológicas**

La principal función de FLNa es la construcción de redes ortogonales de actina (Bennett y col., 1984; Brotschi y col., 1978; Stossel y col., 2001). Estas redes son ancladas por FLNa a la membrana plasmática proporcionándole elasticidad, regulando la difusión interna de agua, solutos y pequeños orgánulos, proporcionando resistencia ante flujos hidrostáticos y osmóticos débiles, y sirviendo de anclaje para contracciones débiles. Constituyen, además, barreras para el movimiento espontáneo de grandes orgánulos y localizan las señales de transducción y otras reacciones intracelulares (Stossel y col., 2001).

FLNa funciona también como anclaje para señalización celular, conectando y coordinando una gran variedad de procesos celulares con la dinámica de regulación del citoesqueleto de actina (Feng y Walsh, 2004). Algunos de estos procesos celulares son el mantenimiento de la estabilidad de la membrana plasmática y la correcta locomoción celular (Cunningham y col., 1992), la generación de amplias protrusiones de superficie celular necesarias para la locomoción y la fagocitosis en las formas ameboides de *Dictyostelium* (Cox y col., 1996), y el tráfico de distintas moléculas de carga. En este sentido, FLNa regula la transcitosis de albúmina a través del endotelio (Sverdlov y col., 2009), el tráfico del receptor de opioides (Onoprishvili y col., 2003), el reciclaje del receptor de calcitonina (Seck y col., 2003), la internalización de CCR2B (Minsaas y col., 2010), la distribución subcelular y la capacidad de



señalización de FcγRI (Beekman y col., 2008), y la infección por SV40 (Pelkmans y col., 2001) y por VIH (Jiménez-Baranda y col., 2007).

La función que FLNa tiene en señalización viene mediada por su capacidad para interactuar con gran cantidad de proteínas señalizadoras, como GTPasas de las familias Ras y Rho y quinasas, y con receptores de la MP, como las integrinas-β y la glicoproteína-Iba (GPIba) (Tabla III) (Stossel y col., 2001; van der Flier y Sonnenberg, 2001). La FLNa se asocia también con membranas lipídicas (Isenberg, 1991; Isenberg y Niggli, 1998).

**Tabla III. Proteínas que interactúan con FLNa.** Se detalla el nombre de la proteína, el tipo de interacción, el método usado para identificar la interacción, el sitio de unión en FLNa y el significado funcional de la asociación. Las filas sombreadas en azul se corresponden con proteínas transmembrana, en amarillo con proteínas de señalización y en rosa con otras proteínas citoplasmáticas.

Proteína	¿Unión directa?/Método	Sitio de unión en FLNa	Significado funcional	Referencia
GPIba	Sí	Repeticiones 17-19	Extensión celular (spreading) REFS	(Meyer y col., 1997; Takafuta y col., 1998 )
Integrinas (β1A, β1D, β2, β3, y β7)	Sí/Doble híbrido	Repeticiones 20-24	Mecanoprotección	(Loo y col., 1998; Sharma y col., 1995)
FcγRI	¿?	¿?	¿?	(Ohta y col., 1991)
Factor de crecimiento	¿?	Repeticiones 23-24		(Ott y col., 1998)
Presenilina 1 y 2	Sí/Doble híbrido	Repeticiones 21-24	¿?	(Zhang y col., 1998)
Receptor de furina	Sí/Doble híbrido)	Repeticiones 13-14	Internalización de furina y transporte desde endosomas tempranos hasta el Golgi	(Liu y col., 1997)
Cav1	Sí/Doble híbrido, colocalización y coimmunoprecipitación	Repeticiones 22-24	¿?	(Ravid y col., 2008 ; Stahlhut y van Deurs, 2000; Sverdlov y col., 2009)
Canal de K (Kv4.2)	Sí/Doble híbrido y colocalización	C-terminal	Densidad mediada por estos canales	(Petrecca y col., 2000)
Receptor de dopamina D2 y D3	Sí/doble híbrido	Repeticiones 16-19	Respuesta a dopamina	(Li y col., 2000)
TRAF2	Sí/doble híbrido	Repeticiones 15-19 y 21-24	IActivación de SAPK o NF-κB por TRAF2 o TNF	(Leonardi y col., 2000)
SEK-1 (MEKK y JNKK)	Sí/doble híbrido	Repeticiones 21-24	Respuesta a los activadores de SAPK, ácidos lisofosfatídico y TNF	(Martí y col., 1997)
Receptor de andrógeno	Sí/doble híbrido	Repeticiones 16-19	Translocación del receptor de andrógeno al núcleo	(Ozanne y col., 2000)
RhoA, Rac1, Cdc42	Sí (dependiente de GTP) /Doble híbrido	Repeticiones 21-24	¿?	(Ohta y col., 1999)
RalA	Sí (independiente de GTP) /Doble híbrido	Repetición 24	Formación de microespinas inducida por Cdc42	(Ohta y col., 1999)
Trio	Sí/doble híbrido	Repeticiones 23-24	Ondulaciones dorsales de MP	(Bellanger y col., 2000)
cvHSP	Sí/doble híbrido	Repeticiones 23-24	¿?	(Krief y col., 1999)
Granzima B	Sí/doble híbrido	Repeticiones 20-24	Apoptosis mediada por granzima B	(Browne y col., 2000)



## **2. OBJETIVOS**

La internalización de las caveolas ocurre de forma masiva tras la pérdida de adhesión celular (del Pozo y col., 2005). Esta internalización es esencial para el cese de las rutas de señalización iniciadas por receptores de membrana o proteínas citoplasmáticas cuyos sitios de unión a la membrana se encuentran en los CEMMs, tales como las de Ras-ERK-MAPK, Pi3K-AKT y Rac1-Pak1. La continuidad de esta señalización en las células no adherentes puede conducir a situaciones patológicas, como la proliferación celular independiente de adhesión. Por otro lado, la pérdida de adhesión celular ocurre localmente durante varios procesos fisiológicos como la migración y la división celular. Por tanto, y en base a la importancia que subyace tras este proceso, se ha elaborado el primer objetivo de esta Tesis:

**1. Identificar proteínas implicadas en la regulación de la internalización de caveolas inducida por la pérdida de adhesión celular.**

Dado que el citoesqueleto de actina desempeña un papel esencial en otras vías de endocitosis (Doherty y McMahon, 2009), y que presenta un estrecho vínculo con las caveolas y la Cav1 (Kanzaki y Pessin, 2002; Richter y col., 2008; Rothberg y col., 1992; Stahlhut y van Deurs, 2000), se focalizó el primer objetivo en el estudio de proteínas relacionadas con la actina. Esto permitió la identificación de varios reguladores de la internalización de caveolas que estimulan o inhiben el proceso en según el tipo de polimerización de actina que regulan. Por tanto, el segundo objetivo de esta Tesis es:

**2. Determinar el grado de implicación de las principales rutas de regulación del citoesqueleto de actina en la internalización de caveolas.**

Asimismo, se identificó otro regulador, FLNa, cuya implicación en la internalización de caveolas se estudió en mayor profundidad, formulándose así el tercer objetivo de esta Tesis:

**3. Identificar los mecanismos moleculares por los que FLNa regula la internalización de caveolas.**

Además, existen cada vez más evidencias que apoyan un papel de las caveolas en mecanotransducción ante cambios de tensión celular (Boyd y col., 2003; Rizzo y col., 1998; Sinha y col., 2011). Estos hechos llevan a plantear un significado fisiológico de las caveolas adicional al de la endocitosis o regulación de vías de señalización, y que estaría relacionado con el mantenimiento de la homeostasis de membrana. Por ello, el cuarto y último objetivo de esta Tesis es:

**4. Estudiar el significado fisiológico de la internalización de membrana en suspensión mediada por caveolas.**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Anticuerpos y reactivos

**Anticuerpos policlonales:** caveolina (BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA)), fosfo-FLNa (Ser2152), integrina- $\beta$ 3 y PKC $\delta$  (*Cell Signaling*), Dyn2 (*Affinity Bio Reagents*), Rab11 y fosfo-PAK1/2/3 (Ser141) (*Invitrogen*, *Zymed® laboratories*), pericentrina (*Covance* (Denver, PA)), Arg (H-300), PKC $\alpha$ , PAK1 y mDia2 (*Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA)), N-WASP (cedido por el Dr. M. Kirschmer (*Division of Neuroscience, Children's Hospital*, Boston, MA, USA)), FLNb (*Chemicon International*), FBP17 (cedido por Dr. De Camilli, *Yale University School of Medicine*, New Haven, USA).

**Anticuerpos monoclonales:** FLNa (*Chemicon International*),  $\alpha$ -tubulina,  $\gamma$ -tubulina, talina y Flag M2 (*Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO)), GFP (*Roche*), GM130, EEA1, RalA, Csk, CrkII, WAVE-1, mDia1, c-Abl y p21Arc (BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA)), Src, cortactina y Rac1 (*Upstate Biotechnology* (Lake Placid, NY)), RhoA y Grb10 (*Cell Signaling*), HA (*Covance* (Denver, PA)) y  $\alpha$ -actinina (*Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA)).

Los anticuerpos secundarios de cabra conjugados con peroxidasa dirigidos frente a conejo y ratón, y los de cabra anti-IgG de conejo y ratón conjugados con los fluoróforos Alexa-488, 594 y 647 fueron proporcionados por *Jackson Immuno-Research Laboratories*. La faloidina conjugada con el fluoróforo Alexa-647, la subunidad B de la toxina colérica (CTxB) conjugada con el fluoróforo Alexa-594, la transferrina conjugada con Alexa-488 o Texas Red (TxRed), y la aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada con Alexa-488 fueron adquiridas de *Molecular Probes Inc.* Los agentes despolimerizadores de actina (citocalasina D y latrunculina A) así como el agente despolimerizador de microtúbulos (nocodazol), el DMSO, el compuesto Hoechst 33342, y los antibióticos puromicina y neomicina (G418) fueron obtenidos de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO). El inhibidor de PKA (H-89) y los inhibidores de PKC (Ro-31-8220 y Gö 6076) fueron obtenidos de *Calbiochem*. La fibronectina fue purificada a partir de plasma humano según se ha descrito previamente (del Pozo y col., 2000). El reactivo de transfección de DNA (Fugene 6) se obtuvo de *Roche*. El reactivo de transfección de oligonucleótidos de ARNi (Oligofectamina) se obtuvo de *Invitrogen*. El medio de montaje Permafluor se se obtuvo de *Thermoscientific*.

### 3.2. ARNch y ARNi

Los vectores retrovirales pSMC2 que codifican para los ARNch de FLNa o luciferasa, descritos previamente (Baldassarre y col., 2009), fueron cedidos por el Dr. David A. Calderwood (Yale University, New Haven, CT).

Los oligonucleótidos de ARNi que se han utilizado en este trabajo se muestran en la tabla IV:

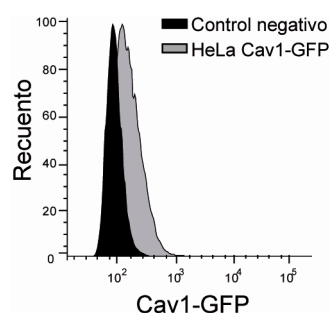
**Tabla IV: Listado de los ARNi utilizados.** Se detallan los ARNi, la secuencia diana en el ARNm y la procedencia.

ARNi	SECUENCIA DIANA	PROCEDENCIA
Abi1	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
Abi2	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
$\alpha$ -actinina1#1	GACCATTATGATTCTCAGCAA	Qiagen
$\alpha$ -actinina4#1	CCCGCAAATCATCAACTCCAA	Qiagen
$\alpha$ -actinina1#2	GCGCACCATCATGGACCATTA	Qiagen
$\alpha$ -actinina4#2	ACGCAGCATCGTGGACTACAA	Qiagen
$\alpha$ -actinina1#3	AAGGATGATCCACTCACAAAT	Qiagen
$\alpha$ -actinina4#3	TCCACTCTGTATCTATGCAAA	Qiagen
Arp3	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
Arg #1	GGCACTAAATGAGGTTATC	Ambion
Arg #2	AACCCTGTCCTTAATAACTTA	Qiagen
c-Abl #1	GGGAGGGTGTACCATTACA	Ambion
c-Abl #2	AACCAAGCCTTTGAAACAATG	Qiagen
Control #1 “on-target plus control”	?	Dharmacon
Control #2 “all star control”	?	Qiagen
Cortactina #1	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
CrkII #1	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
CrkII #2	AATCCGGGACAAGCCTGAAGA	Qiagen
Csk	GGCGGGTACCAAACCTCAGC	Ambion
mDia1	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
mDia2	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
Dyn2	GACATGATCCTGCAGTTCA	Dharmacon
FBP17	GACATGATCCTGCAGTTCA	Invitrogen
FLNa #1	GGAAGAAGATCCAGCAGAA	Qiagen
FLNa #2	GGCAAAAAGTGACCGCCAAT	Ambion
FLNa #3	CTCGGTGAGTACATCCCTTA	Qiagen
FLNa #4	CAGCGTGTCTACCTGCTCAA	Qiagen
FLNb #1	ACGCATTGACATCCAGATGAA	Qiagen
FLNb #2	CCGCTGGATCTGAGCAAGATA	Qiagen
Formina-1	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
Grb10 #1	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
Grb10 #2	CTAGATGACGGGAACACCAAA	Qiagen
Integrina- $\beta$ 3 #1	GCTAATTCTTTGACCTGTT	Ambion
Integrina- $\beta$ 3 #2	CTCTCCTGATGTAGCACTTAA	Qiagen
P21Arc	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
PAK1	TCCACTGATTGCTGCAGCTAA	Qiagen
PKC $\alpha$ #1	AACCATCCGCTCCACACTAAA	Qiagen
PKC $\alpha$ #2	CGCAGTGGAATGAGTCCTTTA	Qiagen
PKC $\alpha$ #3	TACAAGTTGCTTAACCAAGAA	Qiagen
RhoA #1	CCGGATGAAACTGACCGATTT	Qiagen
RhoA #2	CAAGCTAGACGTGGGAAGAAA	Qiagen
RhoA #3	TACCTTATAGTTACTGTGTAA	Qiagen
SDPR	CAGAGGATAATTAAGATACTA	Qiagen
Src #1	AAGCAGTGCCTGCCTATGAAA	Qiagen
Src #2	CGGCTTGTTGGGTGATGTTTGA	Qiagen
Talina 1 #1(5552)	GGAAGTTCTTTTACTCAGA	Ambion
Talina 1 #2 (5467)	GGAGGAAATAACAGGGACC	Ambion
N-WASP #1	<i>Smart pool</i>	Dharmacon
N-WASP #2	CAGATACGACAGGGTATCCAA	Qiagen
N-WASP #3	AACCTTAATGTAATTTACTTA	Qiagen

### 3.3. Cultivos celulares

En este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- HeLa (células epiteliales de cáncer cervical humano) fueron obtenidas de ATCC.
- HeLa expresando Cav1-GFP de forma estable (HeLa-Cav1-GFP), cedidas por el Dr. Lucas Pelkmans (ETH, Zürich). Se seleccionó una población celular con baja expresión de Cav1-GFP mediante la utilización de un separador de células MoFlo (*DAKO-Cytomation*) (Figura 10).



**Figura 10: Niveles de expresión de Cav1-GFP en células HeLa.** Media de la intensidad de fluorescencia de las células HeLa-Cav1-GFP detectada por FACS. Las células HeLa sin infectar se usaron como control negativo.

- HeLa y HeLa-Cav1-GFP expresando un ARNch contra luciferasa o contra FLNa de forma estable (HeLa-ARNch-Luc o HeLa-ARNch-FLNa) fueron generadas por infección retroviral del vector pSMC2 en células HeLa ATCC y HeLa-Cav1-GFP.
- M2 (células de melanoma humano deficientes en FLNa) y A7 (células de melanoma humano reconstituidas con un ADNc de FLNa), cedidas amablemente por Thomas P. Stossel (*Brigham and Women's Hospital*, Boston, Massachusetts) y Santos Mañes (Centro Nacional de Biotecnología, UAM, Madrid).
- M2 y A7 expresando Cav1-GFP o Cav1-Flag de forma estable (M2-Cav1-GFP, M2-Cav1-Flag, A7-Cav1-GFP y A7-Cav1-Flag) fueron generadas por infección retroviral de células M2.
- HEK 293T/17 (células de riñón embrionario humano) fueron obtenidas de ATCC.
- Fibroblastos embrionarios de ratones doble KO para c-Abl y Arg (dKO) y reconstituidos con c-Abl y Arg (dRec), cedidos por Tony Koleske (*Yale University*, New Haven, CT) y Ann Marie Pendergast (*Duke University Medical Center*, Durham, NC) (Plattner y col., 2003).
- Fibroblastos embrionarios de ratones WT y KO para Cav1, cedidos por Michael P. Lisanti (*Thomas Jefferson University*; Philadelphia, PA).

Las células HEK 293T/17, fibroblastos de ratón WT y Cav1 KO, y las células HeLa se crecieron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con 10% de



suero bovino fetal (FBS), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Las células HeLa infectadas con ARNch fueron cultivadas con 4µg/ml de puromicina (*Sigma*), como antibiótico de selección. Las células M2 y A7 fueron cultivadas en MEM (*Gibco*) suplementado con 10% de FBS, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), 1% L-Gln, 1 mg/L de piruvato sódico, 1 mg/L de aminoácidos no esenciales. Las células A7 fueron cultivadas con 500 ng/µl de G418 (*Sigma*), como antibiótico de selección. Los fibroblastos de ratón c-Abl/Arg dKO y dRec fueron cultivados en DMEM suplementado con un 10% de FBS.

Todas las células fueron cultivadas a 37° C en una atmósfera humedecida al 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.4. Plásmidos de expresión en mamíferos

**MIGR1-Cav1-Flag:** la construcción que codifica para la Cav1 murina marcada con el péptido Flag en su extremo C-terminal, originalmente clonada en el vector pcDNA3, fue cortada con BamH1 y EcoRI, y posteriormente subclonada en el vector retroviral MIGR1, que incluye GFP en una unidad bicistrónica (Pear y col., 1998).

**MIGR1-Cav1-GFP:** la construcción que codifica para la Cav1 murina, originalmente clonado en el vector pcDNA3, fue amplificada por PCR usando cebadores que contienen los sitios de restricción PciI y posteriormente subclonada en el vector retroviral MIGR1 usando los sitios de restricción NcoI, compatibles con PciI, quedando en fase corriente arriba de GFP.

**pcDNA3.1-FLNa-WT-ARNchR-ds<sup>R</sup>ED:** la construcción que codifica para FLNa-WT-dsRED resistente al ARNch clonada en pcDNA3.1, previamente descrita, (Baldassarre y col., 2009), fue cedida por el Dr. David A. Calderwood (*Yale University, New Haven, CT*).

**pcDNA3.1-FLNa-S2152A-ARNchR-ds<sup>R</sup>ED:** la construcción que codifica para FLNa-S2152A-dsRED resistente al ARNch fue generada mediante mutagénesis dirigida a partir de la construcción WT (pcDNA3.1-FLNaWT-ARNchR-dsRED) y mediante un proceso que implicó varios pasos: Un fragmento de 4500 pb de FLNa-WT-ARNchR-dsRED fue amplificado por PCR usando unos cebadores que hibridan en regiones que incluyen los sitios de restricción PshAI y XbaI. El resultado de esta amplificación se analizó en gel de agarosa al 0.7% y la banda correspondiente al tamaño del amplicón deseado (4500 pb) fue extraída usando *QIAEXII Agarose Gel Extraction Protocol* (*Qiagen*). Este amplicón fue clonado en el vector pGEMT-easy (Invitrogen) usando los extremos protuberantes en 3' generados durante la amplificación por PCR. Se procedió a la mutagénesis dirigida de la Ser2152 en una Ala usando *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*) y la construcción clonada en pGEMT-easy como molde. El fragmento mutado fue entonces subclonado en el vector original usando los sitios PshAI y XbaI para sustituir el fragmento original no mutado.

**pcDNA3.1-FLNa-S2152E-ARNchR-ds<sup>R</sup>ED:** la construcción que codifica para FLNa-S2152A-dsRED resistente al ARNch fue generada mediante mutagénesis dirigida a partir de la construcción WT (pcDNA3.1-FLNaWT-ARNchR-dsRED) mediante el mismo proceso usado para la construcción pcDNA3.1-FLNa-S2152A-ARNchR-dsRED, pero cambiando el oligonucleótido usado para la mutagénesis.

**pcDNA3.1-FLNa-ABD-ARNchR<sup>R</sup>-dsRED:** la construcción que codifica para FLNa-ABD-dsRED resistente al ARNch fue generada a partir de la construcción WT (pcDNA3.1-FLNaWT-ARNchR-dsRED) mediante un proceso que implicó varios pasos: Un fragmento de 4200 pb de FLNaWT-ARNchR-dsRED fue amplificado por PCR usando unos cebadores que hibridan en regiones que incluyen los sitios de restricción PshAI y PacI. El resultado de esta amplificación se analizó en gel de agarosa al 0.7% y la banda correspondiente al tamaño del amplicón deseado (4200 pb) fue extraída usando *QIAEXII Agarose Gel Extraction Protocol* (Qiagen). Este amplicón fue clonado en el vector pSCA (*Strataclone*) usando los extremos protuberantes en 3' generados durante la amplificación por PCR. Se realizó una nueva PCR usando esta nueva construcción como molde y dos cebadores, fosforilados en 5' que incluyen los sitios de restricción PshAI y PacI, y que hibridan a regiones que excluyen el fragmento de 700 pb a deleccionar. Para esta amplificación se usó la ADN polimerasa *PfuUltra II fusion HS* (Stratagene) que deja extremos romos. Se realizó un tratamiento con la enzima de restricción DpnI para digerir del ADN molde metilado. Seguidamente se ligó el producto de PCR con el uso de la ligasa T4; de esta forma se permitió su replicación en bacterias competentes transformadas con dicha construcción. Tras purificar el producto de PCR circular amplificado en bacterias, se digirió con las enzimas PshAI y PacI y se seleccionó el fragmento de 3,5 kb de interés. Este fragmento fue extraído del gel y subclonado en el vector original usando los sitios PshAI y PacI para sustituir el fragmento original por el nuevo fragmento carente del dominio de unión a actina.

**pEGFP-RhoA-G14V:** la construcción que codifica para RhoA-G14V (forma mutada de RhoA constitutivamente activa) clonada en el vector pEGFP-C1 (*Clontech*, Palo Alto, CA, EEUU) ha sido descrita previamente (del Pozo y col., 1999).

**pmCherryC1-RhoA-G14V:** la construcción que codifica para RhoA-G14V murino, originalmente clonada en el vector pEGFP, fue cortada con BpsEI y EcoRI y posteriormente subclonada en el vector pmCherry (*Clontech*, Palo Alto, CA, EEUU).

**pcDNA3-Dyn2-K44A:** la construcción que codifica para Dyn2-K44A (forma mutada de dinamina-2 que actúa como dominante negativo) clonada en el vector pcDNA3 ha sido descrita previamente (del Pozo y col., 2005).

**pCGN-HA-RalA-WT, -G23V y -S28N:** las construcciones pCGN-HA-RalA-WT, HA-HA-RalA-G23V y RalA-S28N, fueron cedidas por el Dr. Van Tran (*University of Sydney*, NSW).

**pRV-IRES CopGreen Flag-mDia1ΔN3:** la construcción que codifica para Flag-mDia1ΔN3 (forma mutada de mDia1 constitutivamente activa, que carece del dominio N-terminal) fue generada mediante un proceso que implicó varios pasos: el fragmento desde el aminoácido 543 hasta el 1192, que constituyen la forma constitutivamente activa de mDia1 se amplificó por PCR usando cebadores que proporcionaron los sitios de restricción Bgl II en ambos extremos y Flag en el extremo N-terminal. El producto de PCR se clonó en el vector retroviral pRV-IRES CopGreen que codifica para GFP de forma bicistónica.

**pCS2-memb-Cherry:** la construcción que codifica para el fragmento de la proteína quinasa Lck (MGCIKSKRKDNLNDDEAPVA), repetido dos veces, clonada en el vector pCS2, previamente descrita (Megason y Fraser, 2003), fue cedida por la Dr. Nadia Mercader (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, España).

**pCA-EGFP-FBP17:** la construcción que codifica para FBP17 clonada en el vector pCA-EGFP, previamente descrita (Kamioka y col., 2004), fue cedida por el Dr. Naoki Mochizuk (*National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan*).

En todas las construcciones, la orientación y la secuencia correctas fueron comprobadas por secuenciación, y la expresión en células transfectadas por western blot y microscopía de fluorescencia.

### 3.5. Transfección de ADN y de ARNi

Los plásmidos de expresión en mamíferos fueron transfectados usando Eugene (*Roche*), según las indicaciones de la casa comercial. Los oligonucleótidos de ARNi (30, 75 ó 100 nM) fueron transfectados en las células HeLa utilizando Oligofectamina (*Invitrogen*), según las indicaciones de la casa comercial.

### 3.6. Generación de líneas celulares estables por infección viral

Para la producción de retrovirus, las células 293T/17 fueron transfectadas con los vectores retrovirales (MIGR1-Cav1-Flag, MIGR1-Cav1-GFP, pSMC2-ARNch-FLNa o pSMC2-ARNch-Luc) y con los vectores que codifican los componentes de las partículas virales (pGAGPOL y VSVG). Para ello se usó Eugene 6 (*Roche*). Tras 24 horas desde la transfección se cambió el medio por uno fresco, y el sobrenadante fue recogido durante los 3 días posteriores al cambio de medio y almacenado a 4° C. Seguidamente, se procedió a la concentración de las partículas retrovirales. Para ello, los sobrenadantes cargados de partículas retrovirales se filtraron a través de filtros de 0.45 μm y se centrifugaron a 25000 rpm a 4°C durante 2 horas. Tras eliminar el sobrenadante, el *pellet* donde se encuentran las partículas retrovirales se resuspendieron en

medio de cultivo y se añadió a las células diana. Después de 48 horas, se comenzó la selección de las células infectadas, usando puromicina en el caso de las células infectadas con las construcciones pSMC2-ARNch-FLNa y pSMC2-ARNch-Luc o utilizando un separador de células MoFlo (*DAKO-Cytomation*) para detectar y aislar las células expresando GFP en el caso de las infecciones con las construcciones MIGR1-Cav1-Flag y MIGR1-Cav1-GFP. El correcto silenciamiento de FLNa en las células infectadas con la construcción pSMC2-ARNch-FLNa se comprobó por WB y los niveles de expresión de las construcciones MIGR1-Cav1-Flag y MIGR1-Cav1-GFP se comprobaron tanto por WB como por citometría de flujo. Con estas mismas técnicas se comprobó también que los niveles de expresión de Cav1-Flag o Cav1-GFP eran muy similares entre las líneas celulares A7 y M2.

### 3.7. Extracción proteica e inmunodetección (*Western blot*)

Para el análisis de cantidades proteicas, las células se rompieron usando el tampón RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% dodecil sulfato de sodio (SDS), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA y 3 mM EGTA) con inhibidores de fosfatasa (1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y 30 mM NaF) e inhibidores de proteasas (1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinina, 1  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptina y 1  $\mu\text{M}$  PMSF). Para estudiar la fosforilación de FLNa se añadieron al RIPA dos inhibidores de fosfatasa adicionales (10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  y 3 mM  $\beta$ -glicerolfosfato). La concentración de proteína se cuantificó usando el método de Lowry (*DC Protein Assay de Bio-Rad*). Cantidades iguales de proteína (20-40  $\mu\text{g}$ ) de cada extracto proteico se desnaturalizaron a 95°C en tampón Laemmli, se cargaron en geles de poliacrilamida (con porcentaje de acrilamida en función del peso molecular de la proteína a analizar) en presencia de SDS y se separaron mediante electroforesis. Tras ésta, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond C; Amersham Pharmacia Biotech, UK*). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en una solución de leche en polvo desnatada al 5% en TBS 0,1% Tween-20. A continuación, las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos específicos correspondientes disueltos en solución de bloqueo, excepto para detectar FLNa fosforilada, en cuyo caso el anticuerpo primario se disolvió en una solución de BSA al 5% en TBS 0.1% Tween-20 y se incubó durante toda la noche a 4°C. Después de lavar las membranas con TBS-Tween, fueron finalmente incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Las proteínas se visualizaron utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL siguiendo el protocolo de Amersham. El análisis densitométrico se realizó utilizando *Quantity One*. Las unidades expresadas son arbitrarias.

### **3.8. Ensayos de internalización de Cav1 en suspensión y de reciclaje tras recuperación de adhesión**

El ensayo de internalización inducido por levantamiento celular ha sido descrito previamente (del Pozo y col., 2004). Las células se despegan del sustrato usando una mezcla de tripsina y EDTA. Seguidamente se transfieren a tubos graduados con una solución de metilcelulosa (0.5% (p/v) metilcelulosa, 0.2% (p/v) albúmina de suero bovina libre de lípidos, 0.5 mg/ml inhibidor de tripsina de soja y 10 mM de HEPES) donde se mantiene rotando a 37°C durante los tiempos requeridos para el experimento. Tras este tiempo las células se fijaron durante 10 minutos en hielo con 4% (p/v) paraformaldehído en PBS. En este paso las células expresando Cav-1-GFP se montaron sobre el portaobjetos usando como medio de montaje permafluor (*Thermo scientific*).

Para el estudio del reciclaje de Cav1 las células, tras haber estado 2 horas en suspensión, se sembraron en placas de 24 pocillos, sobre cubreobjetos tapizados con fibronectina (5 µg/ml). Tras diferentes tiempos de recuperación de la adhesión se procedió a la fijación durante 10 minutos con 4% (p/v) paraformaldehído en PBS.

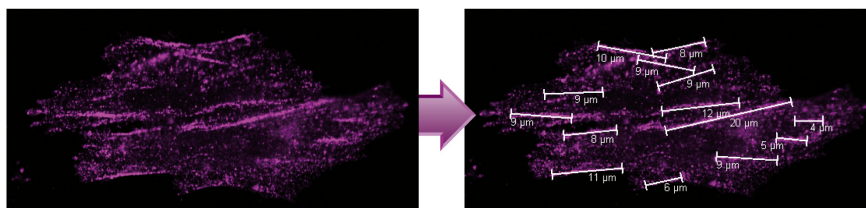
### **3.9. Ensayos de cierre de herida *in vitro***

Las células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa se crecieron hasta confluencia en placas de 6 pocillos y fueron privadas de suero 24 horas antes de llevarse a cabo el ensayo. Las incisiones se realizaron con una punta de micropipeta de 1 mm de grosor aproximadamente. El cierre de herida se monitorizó por video-microscopía, tomando imágenes en campo claro en intervalos de 10 minutos durante 24 horas. El área migrada fue calculada restando el área entre los bordes de la incisión a los distintos tiempos del área inicial medida a tiempo 0.

### **3.10. Ensayos de inmunofluorescencia**

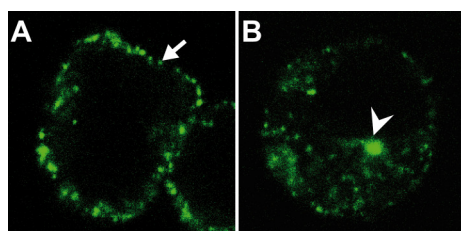
Las células se cultivaron en placas de 6 ó 24 pocillos, sobre cubreobjetos, o fueron puestas en suspensión durante el tiempo requerido. Tras la fijación con 4% (p/v) paraformaldehído en PBS durante 10 minutos, las células se permeabilizaron y bloquearon simultáneamente con PBS 0,2% (v/v) Tritón-X-100 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovina (BSA) durante otros 10 minutos. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora y se tiñeron con un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo Alexa-488 o Alexa-594. Finalmente se montaron sobre portaobjetos. El citoesqueleto de actina fue teñido con faloidina-Alexa-647.

Dependiendo del ensayo, las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal (*Leica TCS SP5* o *SpE*), o bien con un microscopio de epifluorescencia (*Axiovert 200 M SP LSM5*; *Carl Zeiss MicroImaging, Inc.*) equipado con una cámara CCD *CoolSnap fx* (*Photometrics*). Para la determinación de la cantidad de Cav1 con distribución lineal, se identificó la señal de Cav1 organizada en líneas y se midió la longitud de las líneas con el módulo de cuantificación de *MetaMorph* (*Universal Imaging Corp.*) (Figura 11). Se cuantificó un mínimo de 3 experimentos y 50 células por experimento en cada caso.



**Figura 11: Ejemplo demostrativo de la cuantificación de la longitud de las líneas de Cav1.** Se trazaron líneas con *MetaMorph* sobre las líneas de Cav1 identificadas visualmente. Se sumó la longitud de las líneas trazadas.

Para la determinación de Cav1 internalizada se aplicó un método visual semicuantitativo en el que se asigna a una célula la capacidad de internalizar Cav1 cuando presenta una acumulación perinuclear de Cav1 (Figura 12). Se cuantificó un mínimo de 3 experimentos y 150 células por experimento en cada caso.



**Figura 12: Ejemplo demostrativo de los fenotipos cuantificados para la internalización de Cav1.** (A) Ejemplo de célula con señal de Cav1-GFP periférica (flecha). (B) Ejemplo de célula con señal de Cav1-GFP internalizada (cabeza de flecha).

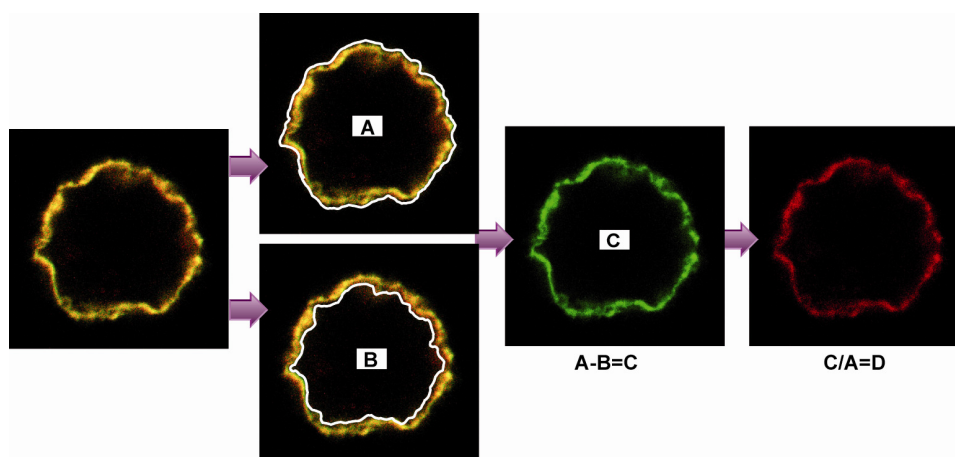
Para la determinación de la colocalización de la acumulación de Cav1-GFP con cada marcador de compartimento intracelular (Pericentrina, Rab11, EEA1 o GM130) se usó el parámetro “cociente de colocalización” de *LAS AF* (*Leica*).

### 3.11. Medida de endocitosis de CTxB por microscopía

Las células se mantuvieron a 4°C durante 10 minutos, luego se añadió CTxB conjugada con un fluoróforo Alexa-594 (1 µg/ml) y dejó que se uniese a su receptor en la MP (GM1) durante 30 minutos a 4°C sin permitir su endocitosis. Seguidamente se retiró la CTxB no unida lavando con PBS a 4°C y las células se levantaron del sustrato para mantenerlas en suspensión durante los tiempos requeridos. Tras la fijación se tiñó la MP con WGA conjugada con un fluoróforo Alexa-488.



Para la determinación de la cantidad de CTxB en la MP se dibujó una máscara por fuera de la MP (canal para WGA) y otra por dentro. Se calculó la intensidad de la señal en el canal rojo (CTxB-Alexa 594) en ambas máscaras utilizando la función *Measure RGB* del módulo de análisis de *Image J*. A continuación se sustrajo a la máscara exterior la intensidad de la máscara interior para obtener la intensidad de señal de CTxB localizada en la MP. Esta señal en la MP se relativizó a la señal en el total de la célula para obtener la cantidad relativa de CTxB en la MP. (Figura 13). Se cuantificó un mínimo de 15 células por experimento.



**Figura 13: Ejemplo demostrativo de la cuantificación de la señal de CTxB en la membrana plasmática.** Se dibujó el contorno externo (A) e interno (B) de la membrana plasmática. Se calculó la intensidad de señal en el canal rojo (CTxB) para cada máscara. Se restó la señal de B a la señal de A generando la señal contenida en la membrana plasmática (C). La señal C se dividió entre la señal A para obtener la señal de CTxB en membrana plasmática respecto a la señal total en la célula.

### 3.12. Citometría de flujo

Para las medidas de viabilidad celular, tamaño, cantidad de actina-F y endocitosis de CTxB se usó el Citómetro de Flujo Analizador CyAn-adp de *Beckman-Coulter*.

Para la medida de la endocitosis de CTxB, las células se mantuvieron en suspensión durante los tiempos requeridos para permitir la internalización de los dominios ricos en GM1. Seguidamente se incubaron con CTxB-Alexa-647 (8 ng/ml) a 4°C durante 30 minutos, dejando que ésta se uniese al GM1 no endocitado. Seguidamente se retiró la CTxB no unida lavando con PBS a 4°C y las células se fijaron con PFA al 1% 10 minutos a 4°C.

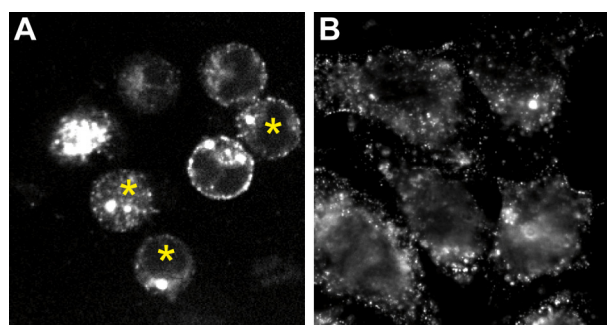
Para la medida de la cantidad de actina-F las células se mantuvieron en suspensión durante una hora, se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con faloidina-Alexa-647.

Para la medida de la viabilidad celular las células se mantuvieron en suspensión durante una hora y se incubaron con yoduro de propidio.

El tamaño de las poblaciones celulares se analizó en células vivas.

### 3.13. Ensayos de video-microscopía

**Video-microscopía de fluorescencia confocal:** el estado de suspensión celular se simuló manteniendo las células en una solución diluída de tripsina y EDTA durante 70 minutos. La secuencia de imágenes se adquirió con un microscopio confocal Leica TCS SP5, usando el objetivo de inmersión en aceite de 63 x/1.4 y una excitación de 488nm. Cada 2 minutos se adquirieron 15 imágenes del campo correspondientes a 15 planos *z* diferentes. Para validar este método de suspensión se analizó la correcta recuperación de la adhesión así como el reciclaje de la Cav1-GFP tras la restauración de las condiciones de adhesión en placas de 24 pocillos, sobre cubreobjetos tapizados con fibronectina (5 µg/ml) (Figura 14), y la viabilidad celular estimada como el % de células que incorporan ioduro de propidio analizado por citometría de flujo.



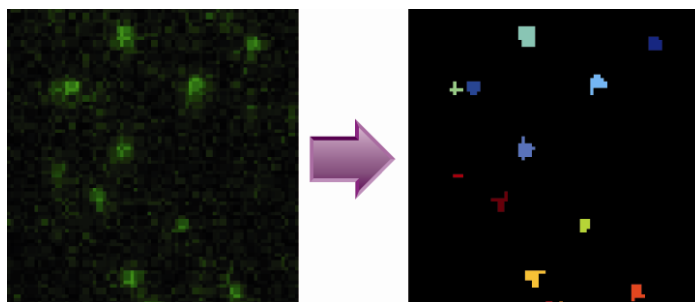
**Figura 14: Las células mantenidas con una solución diluída de tripsina y EDTA internalizan Cav1-GFP y la reciclan tras la recuperación de la adhesión en FN. (A)** Célula HeLa-Ca1-GPF con Cav1-GFP internalizada (asteriscos) tras mantenerse 60 min en una solución de tripsina y EDTA. **(B)** Células HeLa-Cav1-GFP con recuperación de la distribución habitual de Cav1 tras la recuperación de la adhesión en FN.

**Video-microscopía TIRF:** la secuencia de imágenes se adquirió con un microscopio *Leica AM TIRF MC (TIRF)* usando el objetivo de inmersión en aceite 100x/1.4, una excitación de 488nm y un campo de evanescencia con una profundidad de penetración nominal de 90 nm. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara ANDOR iXon CCD cada 85 o 300ms.

### 3.14. Análisis del tamaño y movimiento de vesículas de Cav1-GFP en películas de TIRF

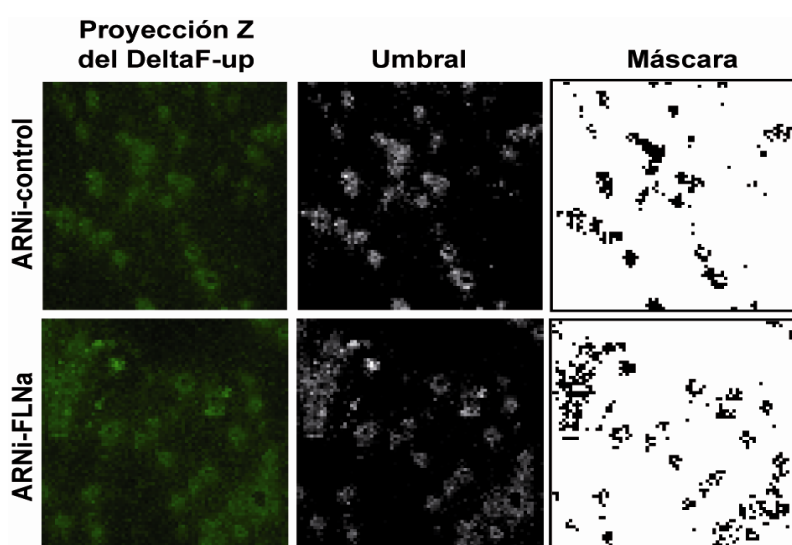
Las vesículas fueron identificadas automáticamente usando *Cellprofiler* <http://www.cellprofiler.org/> (Carpenter y col., 2006). Para identificar las vesículas se limitó el tamaño del objeto a un diámetro de 1-9 píxeles. Se usó una mezcla interna de algoritmos Gaussianos para asignar un mismo umbral de tamaño a todas las imágenes, asumiendo que el 0.01% de la imagen está ocupada por vesículas. Luego se aplicó un factor de corrección de umbral de 1.4 (Figura 15).





**Figura 15: Ejemplo demostrativo de la segmentación automática de vesículas de Cav1.** Las vesículas de Cav1-GFP (imagen izquierda) se segmentaron automáticamente (imagen derecha).

Para la determinación de los cambios dinámicos de las vesículas de Cav1-GFP durante largos periodos de tiempo (2-4 minutos) se usó el módulo *DeltaF-up* de *Image J* para sustraer de cada imagen de la secuencia, la previa. Seguidamente se creó la proyección máxima en Z de las secuencias sustraídas, luego se aplicó el umbral automático y se generó una máscara. Finalmente se calculó el área de la señal ocupada por esta máscara y se usó como un estimador de los cambios dinámicos de las vesículas (apariciones y desapariciones en el plano z, fusiones y fisiones y movimiento lateral) (Figura 16).



**Figura 16: Ejemplo demostrativo de la cuantificación de cambios totales en películas de TIRFm.** Se procesaron las imágenes usando el módulo *DeltaF-up* de *Image J*. Luego se cuantificó el área total de la máscara del umbral de la proyección Z de la secuencia de imágenes procesadas con el módulo *DeltaF-up* de *Image J*.

### 3.15. Análisis de trayectorias de vesículas de Cav1-GFP con alta resolución espacio-temporal

El movimiento lateral de las vesículas de Cav1-GFP próximas a la membrana plasmática se monitorizó mediante la adquisición de secuencias de imágenes TIRF (1500 imágenes cada 85 ms) y el subsiguiente análisis usando un *software* específico desarrollado y proporcionado por el Dr. Christian Hellriegel (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Madrid, España) (Hellriegel, 2005). En una secuencia típica (proporcionada como película) las vesículas aparecen

como puntos de intensidad variable, separados unos de otros por pocos  $\mu\text{m}$ . Esta separación es suficiente para marcar la posición de cada vesícula con una precisión de 20 a 50 nm (dependiendo de la proporción señal/fondo), la cual está bastante por debajo del límite de resolución óptico de 300 nm. El centro, la amplitud, la anchura y la posición de cada partícula fueron seguidos durante toda la secuencia de imágenes de manera automática. Algunas vesículas (10-15%) fueron excluidas del análisis porque desaparecían rápidamente del plano de observación o porque se situaban en una región borrosa de forma que no se podía asignar su posición exacta. Para cuantificar el comportamiento de anclaje se definió un evento de anclaje como una situación en la cual la vesícula permanece inmóvil dentro de una posición precisa (30 nm de media) en una escala de tiempo de segundos. En una escala de tiempo menor de 1 s no se puede distinguir entre un enredo localizado y un evento de anclaje real. En escalas de tiempo mayores (más de 10 s), no pudimos distinguir el movimiento vesicular de los efectos del movimiento celular. Por tanto, se eligió el tiempo intermedio de 4.7 s, que se corresponde con 50 fotogramas consecutivos. De esta forma, cada trayectoria (de entre 500 y 1000 fotogramas) se escaneó en segmentos de 50 fotogramas. Se aginó como evento positivo de anclaje aquellos segmentos que permanecieron dentro de un círculo de 30 nm de radio durante este intervalo. Para evitar contar más de una vez un mismo evento cuya duración fuese mayor que 50 fotogramas, se introdujo la condición de que cada nuevo evento de anclaje debía estar separado del anterior por, al menos, 5 fotogramas. De este análisis se obtuvo el número total de eventos en todas las trayectorias, el número total de trayectorias con un mínimo de un evento y el número total de eventos por trayectoria. En un experimento típico se obtuvieron las trayectorias de alrededor 30 vesículas por célula de un total de 5 células por cada uno de los experimentos. Para asegurar la reproducibilidad, los experimentos se repitieron en preparaciones independientes.

### **3.16. Inhibición de la actividad o correcto funcionamiento de proteínas celulares**

Para la inhibición de la actividad de proteínas celulares se hizo un pretratamiento en adhesión durante 30 minutos. El tratamiento continuó luego durante todo el tiempo de suspensión. La concentración final fue de 10  $\mu\text{M}$  para CytD, Noc, LatA, H-89, Ro-31-8220 y de 5  $\mu\text{M}$  para Gö-6976.

### **3.17. Extracción de ARN, reacción de reversotranscripción y PCR cuantitativa**

El ARN total se extrajo con *Absolutely ARN kit* (Stratagene), el ADN complementario se obtuvo a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN total usando *Omniscript RT kit* (Qiagen). La PCR cuantitativa se realizó en el *Sequence Detection Systems ABI 7000* (Applied Biosystems) usando *SYBR Green kit* (Roche Diagnostics GmbH) y las parejas de cebadores específicos (Tabla V). La temperatura de

anillamiento usada fue de 62° C y la fluorescencia fue medida al final de cada ciclo de elongación. Tras la amplificación, los productos de PCR fueron confirmados por el análisis de la curva de disociación. El análisis de los resultados obtenidos se realizó con el programa *qBase plus 1.0*.

**Tabla IV: Oligonucleótidos de ADN usados para qPCR.**

Nombre del gen	Oligonucleótido de ADN
Arp3	GCGATATGCAGTTTGGTTTGG
Arp3	TTTGGTGTGGCATACTTGGTAGA
Cav1	GATCAGTGGGCCTCCAAGG
Cav1	GCTCACACAATGGCCTCCAT
P21Arc	AAAGAAATGTATACGCTGGGAATCA
P21Arc	GTTTGGCATAAATTGCGTTAAGTG
GAPDH	ATCACCATCTTCCAGGAGCG
GAPDH	CCTGCAAATGAGCCCCAG
β-actin	CACCTTCCAGCAGATGTCTGA
β-actin	AGCATTTGCGGTGGACGATGG

### 3.18. Análisis estadístico

La estadística de todos los datos fue estimada mediante la prueba *t de Student*, utilizando *GraphPad* para este análisis. Los resultados fueron considerados significativos con un valor  $p \leq 0.05$ . Valores de  $P < 0.05$  se marcaron con “\*”, valores de  $P < 0.01$  se marcaron con “\*\*” y valores de  $P < 0.005$  se marcaron con “\*\*\*”.



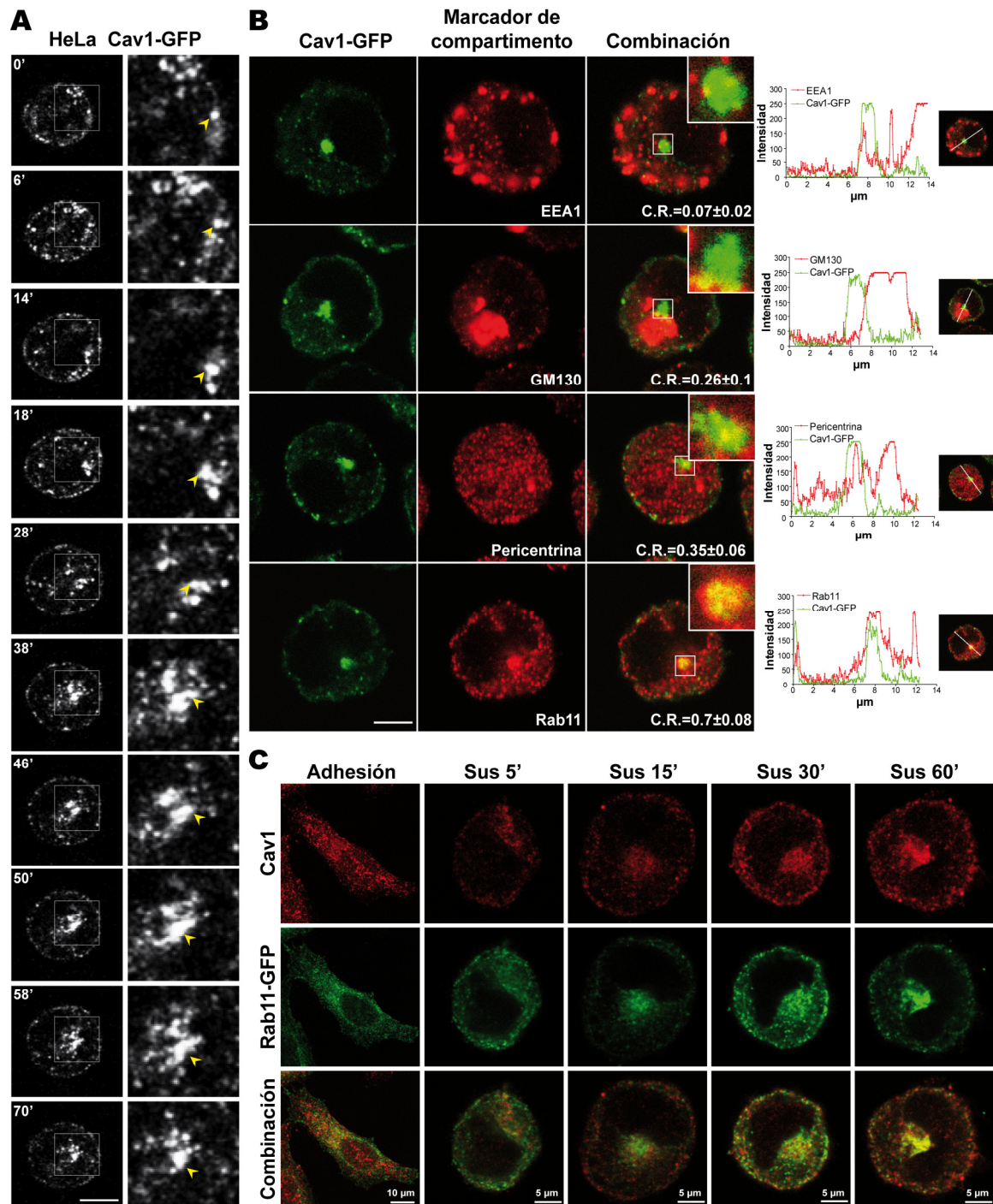
## 4. RESULTADOS

## 4.1. Validación del sistema celular HeLa-Cav1-GFP para el estudio de la internalización de caveolas tras la pérdida de adhesión celular

### 4.1.1. Cav1-GFP se internaliza tras la pérdida de adhesión celular y se recicla tras la recuperación de la adhesión

Trabajos previos del laboratorio demostraron que la Cav1 se internaliza rápidamente tras la pérdida de adhesión celular (del Pozo y col., 2004; del Pozo y col., 2005) y se acumula en un compartimento perinuclear aún no caracterizado. Para confirmar que la acumulación perinuclear de Cav1 ocurre como consecuencia de un proceso activo de internalización, descartando que se deba a un proceso pasivo resultante de un bloqueo de la exocitosis, se analizó el tráfico de Cav1 tras la pérdida de adhesión celular usando video-microscopía. Este abordaje permitió monitorizar el movimiento de la Cav1 marcada con GFP desde la MP hacia el compartimento perinuclear en células HeLa en suspensión (Figura 17A y video-microscopía 1). La identificación de este compartimento intracelular se llevó a cabo realizando inmunofluorescencias de las células con anticuerpos específicos de marcadores de distintos compartimentos celulares: antígeno 1 de endosoma temprano (EEA-1, endosomas tempranos), GM130 (aparato de Golgi), pericentrina (centro organizador de microtúbulos-MTOC) y Rab11 (endosomas de reciclaje-ER). Para calcular el grado de colocación entre la Cav1-GFP internalizada y cada marcador se usó el cociente de colocación (CR), y para comparar los perfiles de intensidad de la señal de GFP y de cada marcador se dibujó una línea recta sobre el diámetro de la célula atravesando la acumulación de Cav1-GFP (Figura 17B). Cav1-GFP y EEA-1 mostraron perfiles de intensidad muy diferentes y poca colocación ( $CR = 0.07 \pm 0.02$ ) (Figura 17B). Con GM130 y pericentrina también se obtuvieron CRs bajos ( $0.26 \pm 0.1$  y  $0.35 \pm 0.06$ ) así como perfiles de intensidad muy diferentes a los de la Cav1-GFP (Figura 17B). Por el contrario, la tinción de Rab11 solapó significativamente con la acumulación interna de Cav1-GFP ( $CR = 0.7 \pm 0.08$ ). Además, ambos canales mostraron perfiles de intensidad muy similares (Figura 17B), sugiriendo que el ER es el compartimento donde se acumula la Cav1-GFP en suspensión.

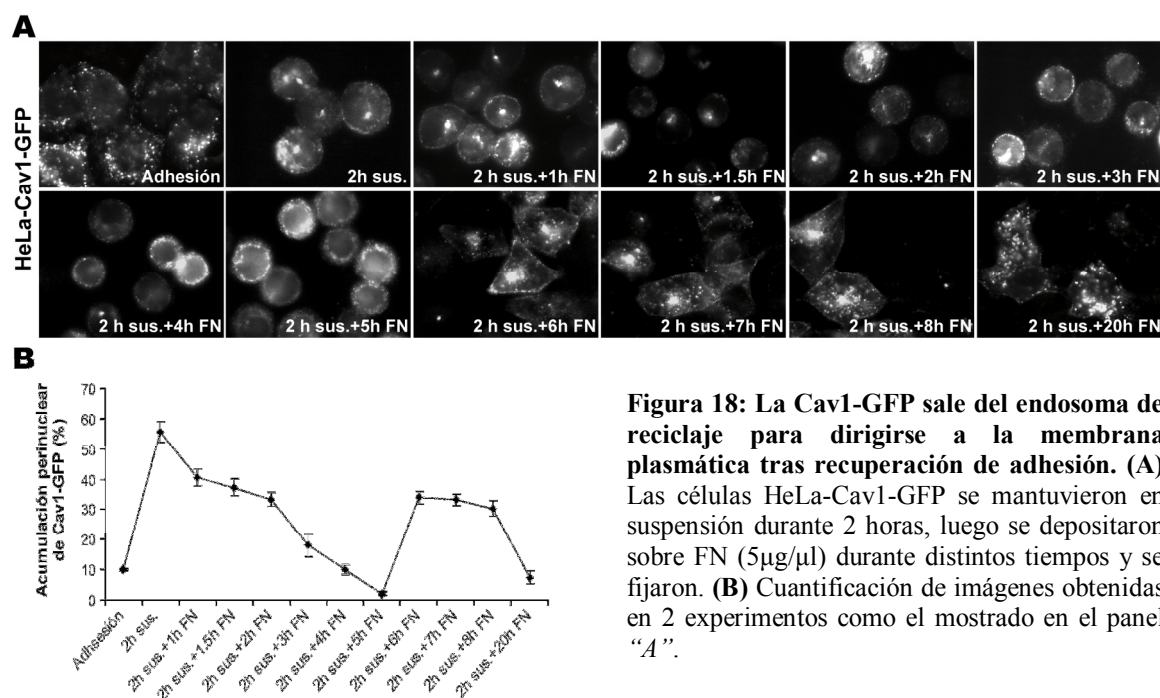
Para averiguar si esta colocación entre Cav1 y Rab11 es constitutiva o si, por el contrario, se induce tras la pérdida de adhesión celular, se analizó la localización de ambas proteínas, en este caso Cav1 endógena y Rab11-GFP sobreexpresada, en células en adhesión y a distintos tiempos de suspensión. La colocación entre los dos marcadores fue muy baja en células adherentes, mientras que incrementó progresivamente durante la suspensión (Figura 17C). Estos datos indican que, en condiciones no adherentes, la célula internaliza la Cav1 de forma activa hasta acumularla en un compartimento endosomal de reciclaje.



**Figura 17: Cav1-GFP se internaliza en un endosoma de reciclaje tras la pérdida de adhesión celular.** (A) Fotogramas seleccionados de una videomicroscopía de células HeLa-Cav1-GFP en suspensión. Las cabezas de flecha señalan una vesícula que se mueve desde la periferia hasta el interior celular. Barra, 10  $\mu\text{m}$ . (B) La acumulación perinuclear de Cav1-GFP colocaliza con Rab11. Las células se mantuvieron en suspensión durante 60 min., se fijaron y se incubaron con anticuerpos contra marcadores de compartimentos celulares. Se indica el cociente de colocalización (CR) entre la Cav1-GFP y cada compartimento teñido. Las gráficas muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia para los marcadores de compartimento y para la Cav1-GFP a través del diámetro celular atravesando la acumulación intracelular de Cav1-GFP. Los CR y los perfiles de intensidad se calcularon con el LAS AF. Barra, 5  $\mu\text{m}$ . (C) La colocalización entre Cav1 y Rab11 ocurre a tiempos largos de suspensión. Las células HeLa se transfectaron de forma transitoria con Rab11-GFP y se mantuvieron adherentes o a distintos tiempos de suspensión. Seguidamente, las células se fijaron y se realizó inmunofluorescencia para detectar la Cav1 endógena.



Para comprobar que el compartimento donde se acumula la Cav1 en suspensión es, en efecto, un compartimento de reciclaje se analizó el reciclaje de la Cav1. Para ello se analizó la localización de Cav1-GFP en células que volvieron a recuperar la adhesión sobre fibronectina tras haberlas mantenido dos horas en suspensión (Figura 18). Se probaron distintos tiempos de recuperación de adhesión para estudiar la cinética de reciclaje. Con esta aproximación experimental se observó una disminución del porcentaje de células con acumulación perinuclear de Cav1-GFP directamente proporcional al tiempo de recuperación de adhesión entre los tiempos 1 y 5 horas. Entre las 5 y 6 horas de recuperación de adhesión se encontró un marcado punto de inflexión en el porcentaje de células con Cav1 en distribución perinuclear. A partir de este punto, las células pasaron de estar redondeadas y con la mayoría de la Cav1-GFP en la periferia celular, a estar extendidas y con la Cav1-GFP localizada por toda la célula, incluyendo la región perinuclear. Estos resultados sugieren que en condiciones basales de adhesión la Cav1 se encuentra en un estado estacionario entre la internalización total (endosoma de reciclaje) y la exocitosis total (membrana plasmática), y que este estado estacionario se ve alterado hacia la primera condición en suspensión y hacia la segunda tras 5 horas de recuperación de adhesión o estimulación de las integrinas con fibronectina (Figura 18). Esta dinámica coincide con la descrita para los CEMM (del Pozo y col., 2005).



**Figura 18: La Cav1-GFP sale del endosoma de reciclaje para dirigirse a la membrana plasmática tras recuperación de adhesión. (A)** Las células HeLa-Cav1-GFP se mantuvieron en suspensión durante 2 horas, luego se depositaron sobre FN (5 $\mu$ g/ $\mu$ l) durante distintos tiempos y se fijaron. **(B)** Cuantificación de imágenes obtenidas en 2 experimentos como el mostrado en el panel "A".

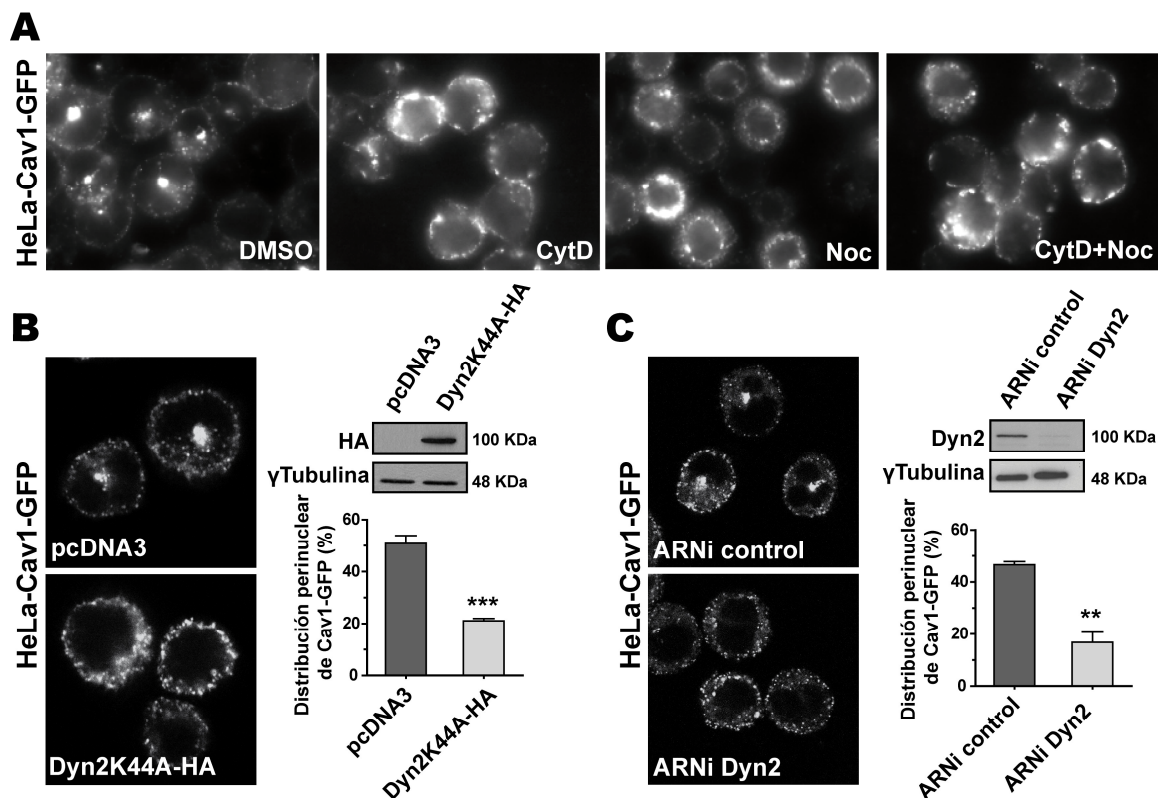


#### 4.1.2. Alteración de la internalización de Cav1-GFP en células HeLa tras el tratamiento con controles positivos

Para abordar el primer objetivo de esta Tesis, “*identificar proteínas implicadas en la regulación de la internalización de caveolas mediada por pérdida de adhesión*”, se usaron las células HeLa-Cav1-GFP. Con el fin de comprobar si estas células constituían un buen sistema experimental para el estudio de la internalización de caveolas, se analizó, a través de tres aproximaciones distintas, el efecto de distintos controles positivos sobre la localización de la Cav1-GFP en suspensión. Estas aproximaciones fueron: 1) el uso de reactivos químicos o toxinas que afectan la función de determinadas proteínas; 2) la sobreexpresión de proteínas mutantes que actúan como dominantes negativos mediante la transfección de vectores de expresión; y 3) la degradación de ARNm codificantes para diversas proteínas mediante ARN de interferencia (ARNi). Como estimador de la internalización se usó la presencia de acumulación perinuclear de Cav1-GFP, tal y como se explica en el apartado de Materiales y Métodos.

Dado que el citoesqueleto desempeña un papel muy importante en la endocitosis de caveolas (Doherty y McMahon, 2009; Parton y col., 1994; Pelkmans y Helenius, 2002), se usaron como controles positivos del primer abordaje, dos compuestos que actúan sobre la estabilidad de los dos principales componentes del citoesqueleto, los filamentos de actina y los microtubulos, cuyo estado de polimerización se ve afectada por la CytD (Brown y Spudich, 1979) y el Noc (Sentein, 1979) respectivamente. Tras el tratamiento de las células HeLa-Cav1-GFP con estos compuestos, de forma separada o conjunta, se observó un bloqueo total de la internalización de Cav1-GFP (Figura 19A). Ésta presentó una distribución periférica muy próxima a la MP tras el tratamiento con CytD y en un anillo interno, entre la periferia celular y la nuclear, en el caso del tratamiento con Noc (Figura 19A). Tras el tratamiento conjunto con CytD y Noc, Cav1 presentó la misma localización que tras el tratamiento con CytD exclusivamente (Figura 19A), sugiriendo que ambas estructuras citoesqueléticas participan en momentos diferentes de la misma ruta endocítica y que el papel de la actina ocurre antes que el de los microtúbulos.

Dinamina-2 (Dyn2), proteína con actividad GTPasa implicada en la fisión de las vesículas de clatrina desde la membrana plasmática, también ha sido identificada como un regulador de la internalización de CEMMs y de caveolas (Doherty y McMahon, 2009). Por este motivo, se usó una forma mutada de Dyn2 que actúa como dominante negativo (Dyn2K44A) (del Pozo y col., 2005) a modo de control positivo para la sobreexpresión de proteínas. Con este tratamiento se observó nuevamente una disminución en el número de células con la acumulación perinuclear de Cav1-GFP (Figura 19B). Para el tercer abordaje se usó también un tratamiento basado en la inhibición de Dyn2, pero en este caso un ARNi específico contra Dyn2. Al igual que con los controles positivos anteriores, en este caso también se observó una reducción en la cantidad de células con acumulación perinuclear de Cav1-GFP (Figura 19C).



**Figura 19: La internalización de Cav1-GFP en células HeLa es sensible al tratamiento con controles positivos para distintos abordajes. (A)** Las células HeLa-Cav1-GFP se mantuvieron en suspensión en presencia de CytD (5 $\mu$ M), Noc (5 $\mu$ M) o ambos (2,5  $\mu$ M + 2,5  $\mu$ M). Para el control negativo se usó un volumen equivalente de DMSO. **(B)** Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con la forma mutada de Dyn2 que actúa como dominante negativo (Dyn2-K44A) o con un plásmido control, y se mantuvieron en suspensión a las 48 horas de la transfección. Se muestra el WB de la sobreexpresión de la construcción mutante y la gráfica de la cuantificación de las células con Cav1-GFP perinuclear. \*\*\* $p$ <0.0001. **(C)** Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con ARNi de Dyn2 o control y se mantuvieron en suspensión a las 48 horas de la transfección. Se muestra el WB del silenciamiento de Dyn2 y la gráfica de la cuantificación de las células con Cav1-GFP perinuclear. \*\* $p$ =0.002. En todos los casos las células se mantuvieron en suspensión durante 1h, luego se fijaron y se analizó la localización de Cav1-GFP por microscopía de fluorescencia. Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba  $t$  de Student. Todos los tratamientos produjeron el bloqueo de la internalización.

Por tanto, estos experimentos demuestran que las células HeLa-Cav1-GFP constituyen un sistema válido para el estudio de la internalización estimulada por la pérdida de adhesión celular al sustrato. Se decidió así usar este sistema celular para el abordaje de silenciamiento con el que se persiguió la consecución del primer objetivo. Asimismo, estos tres abordajes fueron usados a lo largo del desarrollo experimental de esta Tesis para la consecución de los objetivos 2 y 3.

## 4.2. Identificación de reguladores de la internalización de Cav1 mediante abordajes de silenciamiento de proteínas candidatas

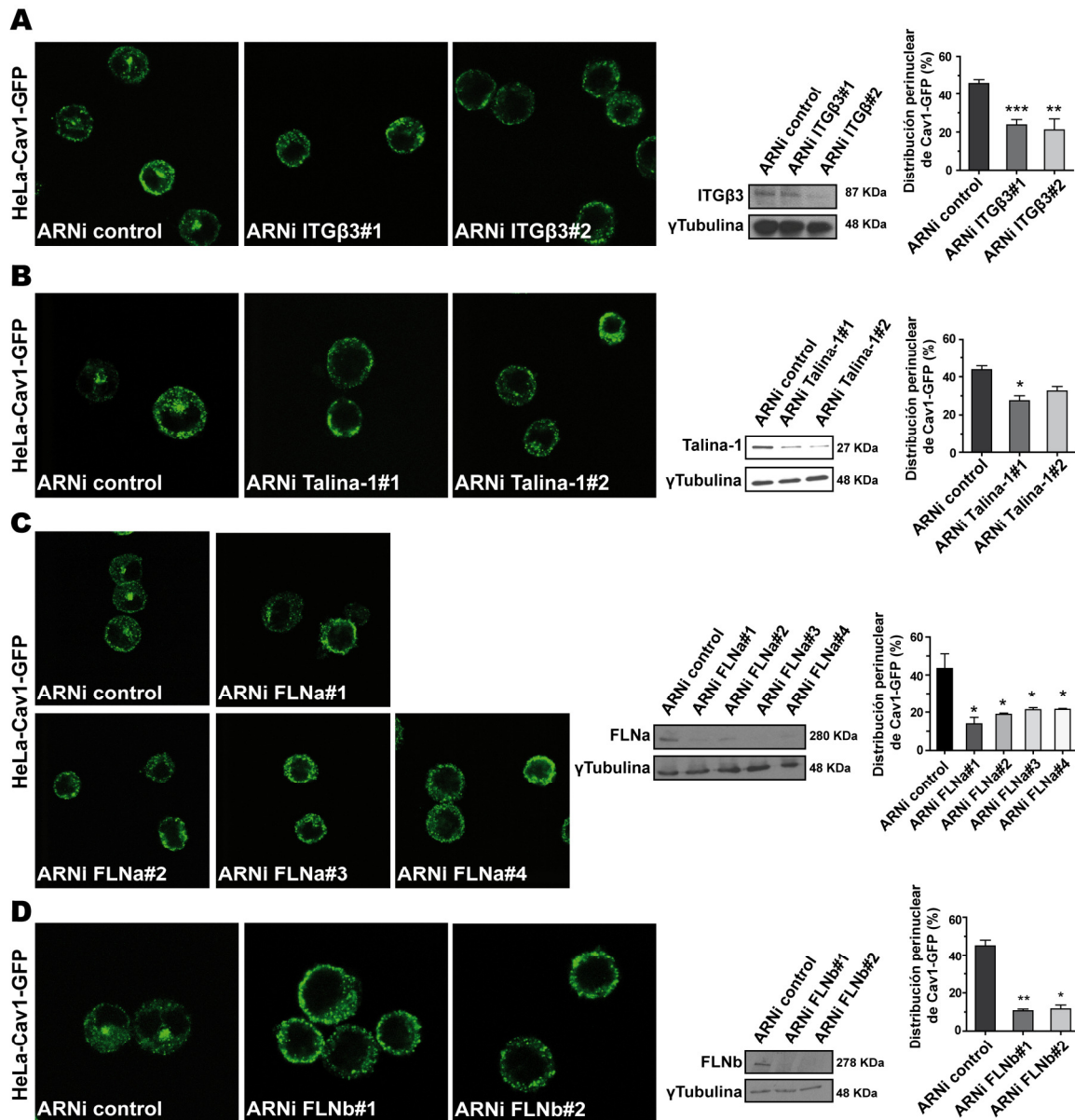
Una vez comprobada la validez del sistema celular de HeLa-Cav1-GFP para el estudio de la internalización de Cav1 se dio paso a los experimentos necesarios para abordar el primer objetivo de esta Tesis. Para ello se analizaron distintas proteínas candidatas mediante un abordaje de ARNi. La selección de estas proteínas candidatas se fundamentó en datos publicados sobre la dinámica de caveolas, sobre su estrecho vínculo con el citoesqueleto de actina o sobre la regulación de otras rutas de internalización. Dado que los oligonucleótidos de ARNi ocasionalmente presentan efectos inespecíficos (*off-target*), al unirse a dianas inespecíficas (Saxena y col., 2003), se usó más de una secuencia en la mayoría de los casos. Se probó, también, en la mayoría de los casos, dosis decrecientes de los ARNi, para minimizar la aparición de efectos inespecíficos.

### 4.2.1. Estudio de la implicación de proteínas relacionadas con la adhesión celular: integrina- $\beta$ 3, talina-1, FLNa y FLNb

Puesto que el proceso de internalización de Cav1 está condicionado por la adhesión celular al sustrato, se decidió estudiar el papel que desempeñan en el mismo las principales moléculas de adhesión a la matriz extracelular, las integrinas. Concretamente, se estudió el efecto en la internalización de Cav1 al silenciar una de las 8 subunidades de integrinas- $\beta$ , la subunidad  $\beta$ 3 (ITG $\beta$ 3) que interacciona con las cadenas  $\alpha$ V y  $\alpha$ IIb para unirse a la fibronectina y fibrinógeno, entre otros ligandos, de la matriz extracelular (Takagi, 2007). Las dos secuencias de ARNi usadas para silenciar ITG $\beta$ 3 bloquearon la internalización de Cav1-GFP. Sin embargo, una de las secuencias (ITG $\beta$ 3#1) no produjo la reducción en los niveles proteicos, sugiriendo que el fenotipo observado tras la transfección de este oligonucleótido se debió a un efecto inespecífico (Figura 20A). Por el contrario, cuando se silenció la subunidad  $\beta$ 1, que también une fibronectina cuando interacciona con la cadena  $\alpha$ 5 (Takagi, 2007), no se observaron efectos sobre la internalización (datos no mostrados), sugiriendo que la ITG $\beta$ 3 cumple funciones específicas sobre la internalización de caveolas.

Otras proteínas analizadas a través de este abordaje fueron la talina-1 y las isoformas A y B de FLNa. La talina-1 interacciona con las integrinas para regular la adhesión a la matriz extracelular. Además desempeña un papel muy importante en el ensamblaje de los filamentos de actina y en la migración (Moser y col., 2009). Las filaminas constituyen una de las familias más importante de proteínas que entrecruzan filamentos de actina e interaccionan con las integrinas, entre otros receptores de membrana (Stossel y col., 2001).

En el caso de talina-1, ambos ARNi produjeron tanto el silenciamiento de la proteína como el bloqueo de la internalización de Cav1-GFP (Figura 20B) sugiriendo su implicación en el proceso. En el caso de las filaminas, se observó el bloqueo de la internalización de Cav1-GFP y el silenciamiento de las proteínas diana con los cuatro ARNi para FLNa y los dos para FLNb (Figura 20C,D).



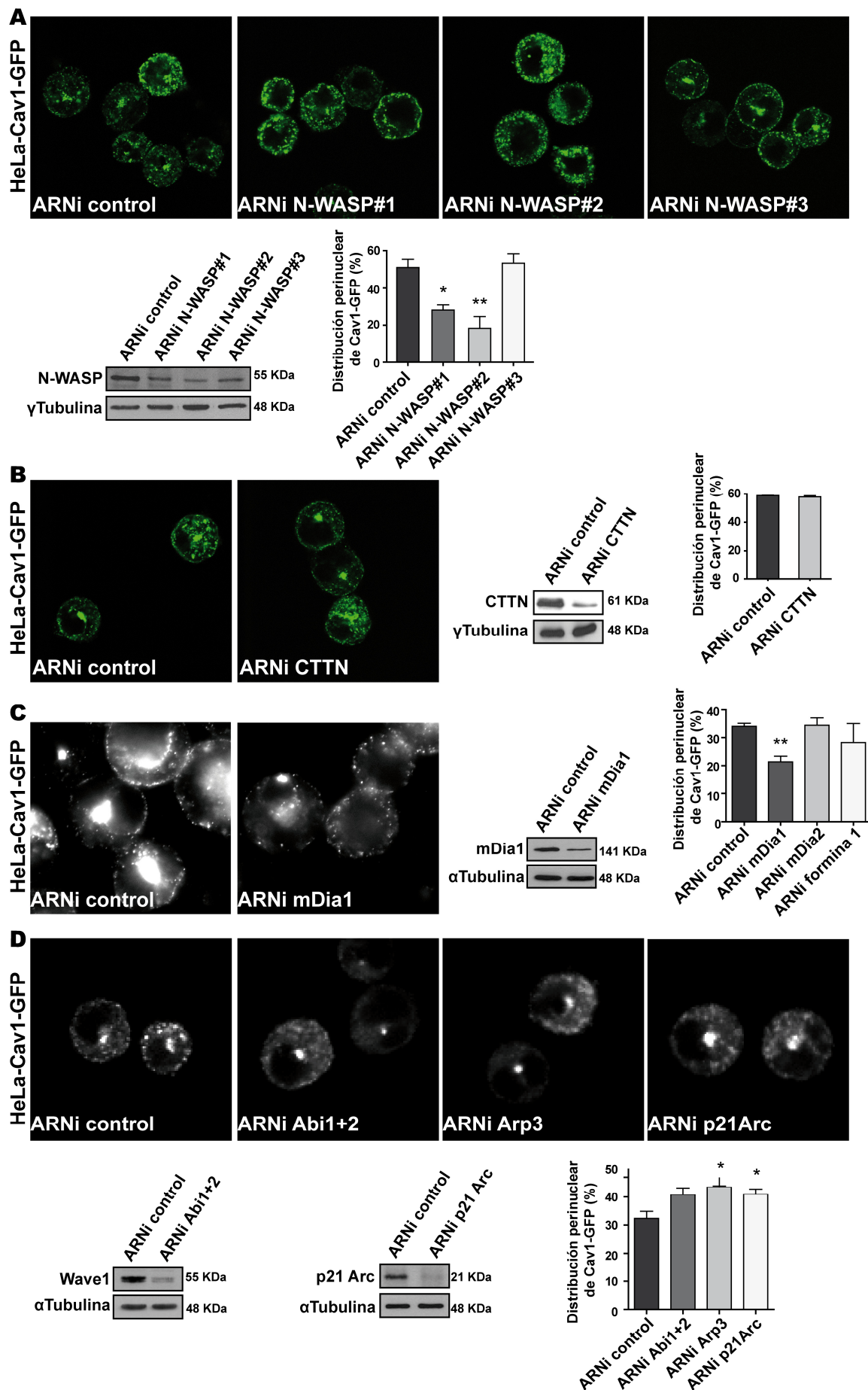
**Figura 20: Efecto de ITGβ3, talina 1, FLNa y FLNb sobre la internalización de Cav1-GFP.** (A) Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con ARNi diferentes de ITGβ3 y se mantuvieron en suspensión a las 48 horas de la transfección. Se muestra el WB del silenciamiento de ITGβ3 y la gráfica de la cuantificación de las células con Cav1-GFP perinuclear. \*\*\* $p=0.0007$  (ITGβ3#1,  $n=4$ ) y \*\* $p=0.006$  (ITGβ3#2,  $n=2$ ). (B) Mismos experimentos que en “A” usando talina 1 como proteína diana.  $p=0.0404$  (talina-1#1,  $n=4$ ) y  $P=0.0718$  (talina-1#2,  $n=2$ ). (C) Mismos experimentos que en “A” y “B” usando FLNa como proteína diana.  $*p=0.0254$  (FLNa#1,  $n=3$ ),  $*p=0.0345$  (FLNa#2,  $n=3$ ),  $*p=0.0478$  (FLNa#3,  $n=3$ ) y  $*p=0.0476$  (FLNa#4,  $n=3$ ). (D) Mismos experimentos que en “A”, “B” y “C” usando FLNb como proteína diana. \*\* $p=0.0082$  (FLNb#1,  $n=2$ ) y  $*p=0.0112$  (FLNb#2,  $n=2$ ). Las células se mantuvieron en suspensión durante 1h, luego se fijaron y se analizó la localización de Cav1-GFP por microscopía de fluorescencia. Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student.

#### **4.2.2. Estudio de la implicación de proteínas reguladoras de la polimerización de actina: WASP, CTTN, formina-1, mDia1, mDia2, Arp2/3 y Abi1/2**

Dado que la biología de las caveolas está estrechamente ligada a la de la actina (Kanzaki y Pessin, 2002; Rothberg y col., 1992; Stahlhut y van Deurs, 2000) y que la actina desempeña un papel crucial en varias vías de endocitosis, incluida la mediada por caveolas (Doherty y McMahon, 2009), se estudió la relevancia en este proceso de proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina, en concreto de aquéllas implicadas en el crecimiento de los microfilamentos. Las proteínas analizadas fueron N-WASP, factor promotor de la nucleación que activa al complejo Arp2/3 para comenzar la polimerización de actina formando ramificaciones (Lee y Domínguez, 2010; Takenawa y Suetsugu, 2007), la cortactina, que también potencia la actividad del complejo Arp2/3 (Cosen-Binker y Kapus, 2006), varios miembros de la familia de las forminas (formina-1, mDia1 y mDia2) que estimulan la polimerización lineal de microfilamentos, las subunidades p21Arc (Arpc3) y Arp3 (Actr3) del complejo Arp2/3 y las proteínas Abi1 y Abi2 que forman parte del complejo WAVE (Lee y Domínguez, 2010).

Las tres secuencias utilizadas en el caso de N-WASP produjeron el silenciamiento de la proteína, aunque con distinta intensidad, pero sólo dos de ellas (N-WASP#1 y N-WASP#2) produjeron el bloqueo de la internalización (Figura 21A). El hecho de que las células KO para N-WASP no presenten defectos en la internalización de Cav1 (dato no mostrado) sugiere que el bloqueo de obtenido con los ARNi de N-WASP se deba a efectos inespecíficos de los oligonucleótidos. La única secuencia usada en el caso de la CTTN no tuvo efecto en el bloqueo de la internalización de Cav1-GFP, a pesar de disminuir los niveles de la proteína (Figura 21B). Para el estudio de la implicación de la formina-1 se usó una sola secuencia sin observar un efecto en la internalización de Cav1. El ARNi usado contra mDia1 resultó en un silenciamiento significativo y un bloqueo de la internalización de Cav1-GFP, al igual que con otros dos ARNi cuyos datos no se muestran en este trabajo. Sin embargo, el silenciamiento de mDia2 no tuvo efecto alguno (Figura 21). Finalmente, tras el silenciamiento de las subunidades del complejo Arp2/3, el cual lo inhabilita funcionalmente, no se observó ningún efecto en la internalización de Cav1, al igual que tras el silenciamiento conjunto de las proteínas Abi1 y Abi2 (Figura 21D).



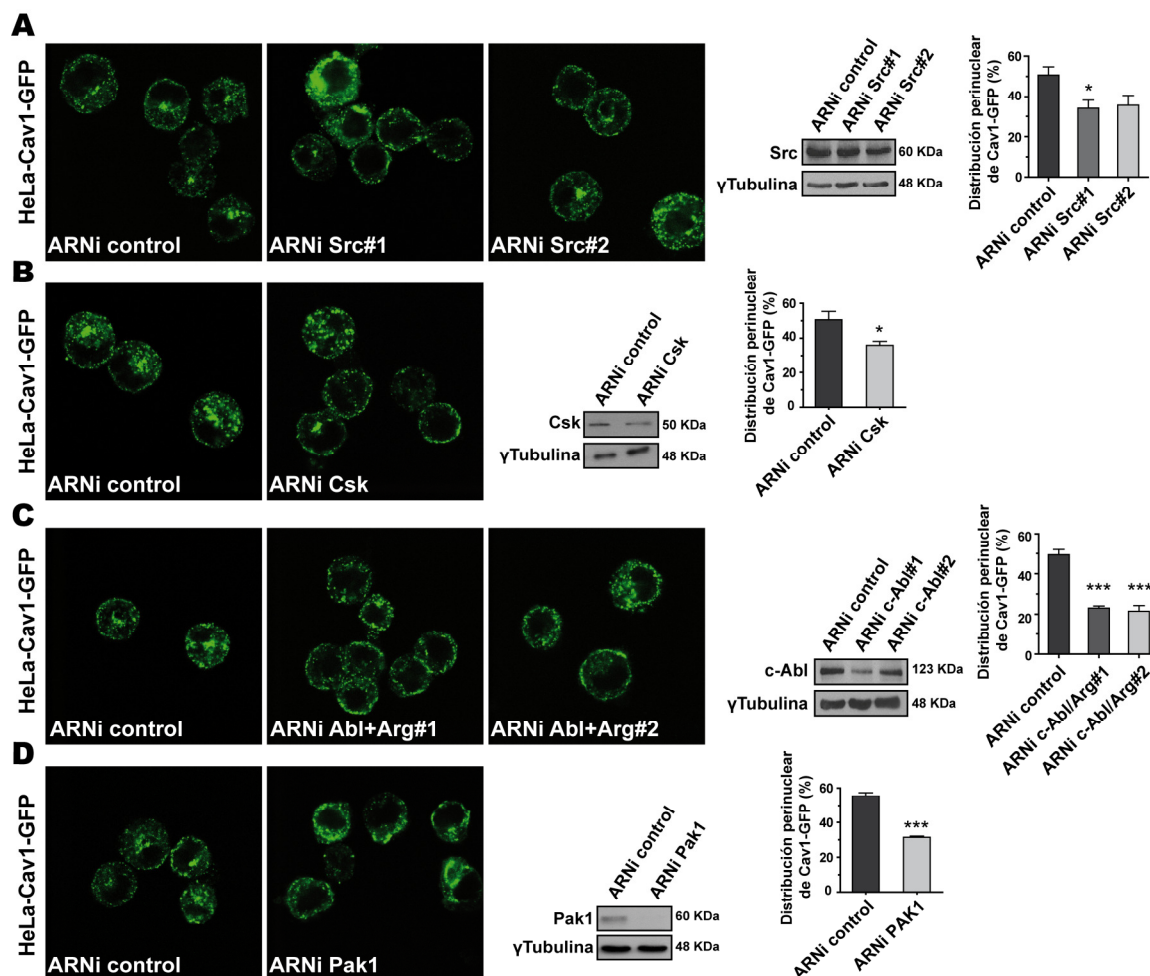


**Figura 21: Efecto de N-WASP, CTTN, formina-1, mDia1, mDia2, Arp2/3 y Abi1/2 sobre la internalización de Cav1-GFP.** (A) Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con ARNi de N-WASP y se mantuvieron en suspensión tras 48 horas de la transfección. Se muestra el WB del silenciamiento de N-WASP y la gráfica de la cuantificación de las células con Cav1-GFP perinuclear.  $*p=0.0264$  (N-WASP#1,  $n=2$ ),  $**p=0.0052$  (N-WASP#2,  $n=4$ ) y  $p=0.7419$  (N-WASP#3,  $n=4$ ). (B) Mismos experimentos que en “A” usando CTTN como proteína diana.  $p=0.3883$  ( $n=2$ ). (C) Mismos experimentos que en “A” y “B” usando mDia1, mDia2 y formina-1 como proteínas diana (de mDia2 y formina-1 sólo se muestra la cuantificación).  $**p=0.0015$  (mDia1,  $n=4$ ),  $p=0.8775$  (mDia2,  $n=3$ ) y  $p=0.3669$  (formina-1,  $n=3$ ). (D) Mismos experimentos que en “A”, “B” y “C” usando Abi1+2, Arp3 y p21Arc como proteínas diana (no se muestra blot de Arp3).  $p=0.05$  (Abi1+2,  $n=5$ ),  $*p=0.0278$  (Arp3,  $n=4$ ) y  $p=0.0466$  (p21Arc,  $n=4$ ). Las células se mantuvieron en suspensión durante 1h, luego se fijaron y se analizó la localización de Cav1-GFP por microscopía de fluorescencia. Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student.

#### 4.2.3. Estudio de la implicación de proteínas quinasas: Src, Csk, c-Abl, Arg y PAK1

La fosforilación de Cav1 en Tyr14 es necesaria para la internalización de caveolas en suspensión (del Pozo y col., 2005), por lo que las siguientes proteínas a estudiar fueron las tirosina quinasas c-Src, Csk, c-Abl y Arg. Cav1 también puede ser fosforilada en Ser80. Se decidió así estudiar la serina quinasa PAK1, que si bien no se ha demostrado que use Cav1-Ser80 como sustrato ni que esta fosforilación sea necesaria para la internalización de caveolas, sí tiene una fuerte conexión con la regulación de la internalización de caveolas al ser un efector de Rac1 (Parrini y col., 2009).

Los dos ARNi usados para silenciar Src produjeron un bloqueo parcial de la internalización de Cav1-GFP. Sin embargo, ninguno produjo la disminución en los niveles proteicos de Src, por lo que los resultados obtenidos se debieron, probablemente, a efectos inespecíficos (Figura 22A). La única secuencia probada para inhibir Csk produjo una leve disminución de la internalización de Cav1 además de disminuir los niveles celulares de la proteína (Figura 22B). Para el caso de las quinasas c-Abl y Arg, se probó el efecto que la inhibición simultánea de ambas proteínas tenía sobre la internalización de Cav1-GFP. Para ello se usaron dos combinaciones de oligonucleótidos, cada una de las cuales resultó en el bloqueo de la internalización de Cav1-GFP. El silenciamiento de c-Abl fue significativo con cualquiera de los ARNi, aunque claramente mayor con el primero. El silenciamiento de Arg fue bueno con el primer ARNi mientras que el segundo se encuentran aún actualmente en fase de validación (Figura 22C). Respecto a PAK1, se usó una única secuencia que redujo tanto la internalización de Cav1-GFP como los niveles proteicos (Figura 22D).



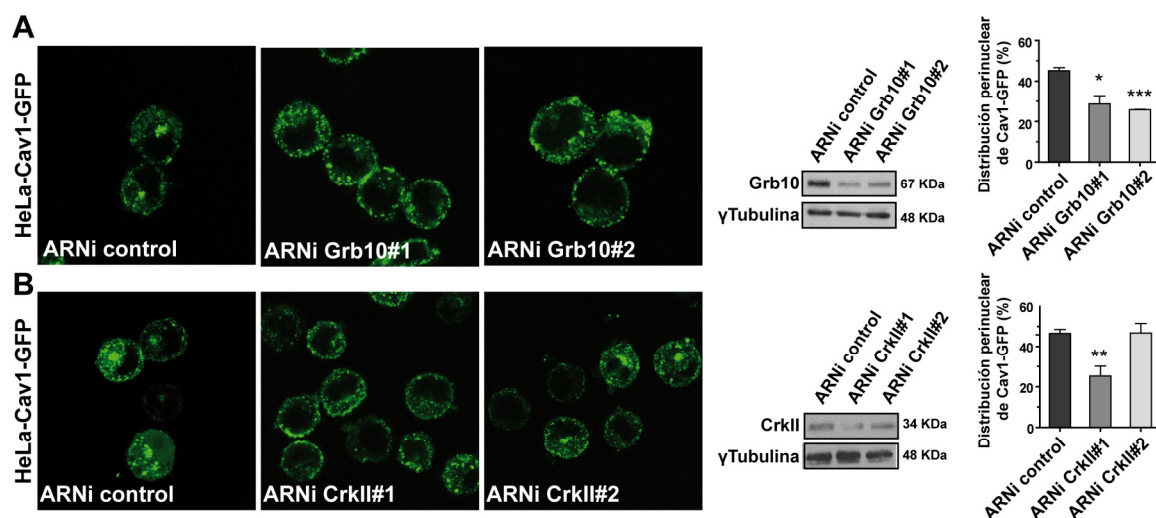
**Figura 22: Efecto de Src, Csk, c-Abl, Arg y PAK1 sobre la internalización de Cav1-GFP.** (A) Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con ARNi de Src y se mantuvieron en suspensión a las 48 horas de la transfección. Se muestra el WB del silenciamiento de Src y la gráfica de la cuantificación de las células con Cav1-GFP perinuclear.  $*p=0.0273$  (Src#1,  $n=4$ ) y  $p=0.0579$  (Src#2,  $n=4$ ). (B) Mismos experimentos que en “A” pero usando Csk como proteína diana.  $*p=0.031$  ( $n=4$ ). (C) Mismos experimentos que en “A” y “B” usando c-Abl/Arg como proteínas diana.  $***p<0.0001$  (c-Abl/Arg#1,  $n=4$ ) y  $***p=0.0002$  (c-Abl/Arg,  $n=3$ ). (D) Mismos experimentos que en “A”, “B” y “C” usando PAK1 como proteína diana.  $***p=0.0003$  ( $n=3$ ). Las células se mantuvieron en suspensión durante 1h, luego se fijaron y se analizó la localización de Cav1-GFP por microscopía de fluorescencia. Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student.

#### 4.2.4. Estudio de la implicación de proteínas adaptadoras: Grb10 y CrkII

Otras proteínas que se testaron en el ensayo de internalización fueron las proteínas adaptadoras Grb10 y CrkII. Grb10 pertenece a la familia de Grb7, cuya unión a Cav1 es dependiente de la fosforilación de ésta en Tyr14 (Cao y col., 2002; Lee y col., 2000). CrkII es una proteína intermediaria en la ruta de señalización de las quinasas c-Abl y Arg (Hernandez y col., 2004) y además está relacionada con la señalización por Rac1 (Henson, 2005), que a su vez está regulada por Cav1 (Cerezo y col., 2009). Las dos secuencias usadas para silenciar Grb10 produjeron un bloqueo parcial de la internalización de Cav1-GFP así como el silenciamiento de la proteína (Figura 23A). Para el caso de CrkII, si bien las dos secuencias probadas redujeron los niveles de la proteína, aunque con distinta intensidad, sólo una de ellas, correspondiente a la que



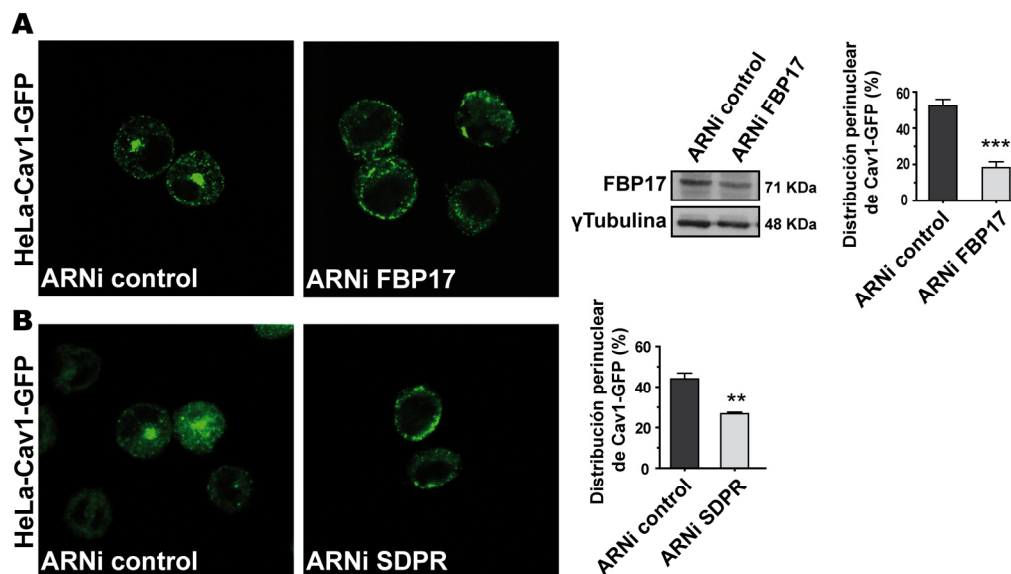
produjo una mayor reducción en los niveles proteicos, resultó en el bloqueo de la internalización de Cav1-GFP (Figura 23B).



**Figura 23: Efecto de Grb10 y CrkII sobre la internalización de Cav1-GFP.** (A) Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con ARNi de Grb10 y se mantuvieron en suspensión a las 48 horas de la transfección. Se muestra el WB del silenciamiento de Grb10 y la gráfica de la cuantificación de las células con Cav1-GFP perinuclear. \* $p=0.0197$  (Grb10#1,  $n=3$ ) y \*\*\* $p=0.0002$  (Grb10#2,  $n=3$ ). (B) Mismos experimentos que en “A” usando CrkII como proteína diana. \*\* $p=0.0062$  (CrkII#1,  $n=3$ ) y  $p=0.0733$  (CrkII#2,  $n=4$ ). Las células se mantuvieron en suspensión durante 1h, luego se fijaron y se analizó la localización de Cav1-GFP por microscopía de fluorescencia. Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba  $t$  de Student.

#### 4.2.5. Estudio de la implicación de proteínas que regulan la curvatura de la MP: FBP17 y SDRP

Por último se estudió la posible participación, en el proceso de internalización de Cav1, de proteínas relacionadas con la regulación de la curvatura de la membrana plasmática. Entre éstas se testaron FBP17 (*formin-binding protein 17*) y SDRP. FBP17 es una proteína con dominio BAR implicada en la inducción de la curvatura de membrana y en la formación de vesículas endocíticas (Kamioka y col., 2004), mientras que SDRP, también llamada cavina-2, participa en la formación de caveolas (Hansen y col., 2009; Nabi, 2009). En ambos casos se probó un único ARNi dirigido contra las secuencias codificantes de dichas proteínas obteniéndose un bloqueo de la internalización de Cav1-GFP (Figura 24A,B).



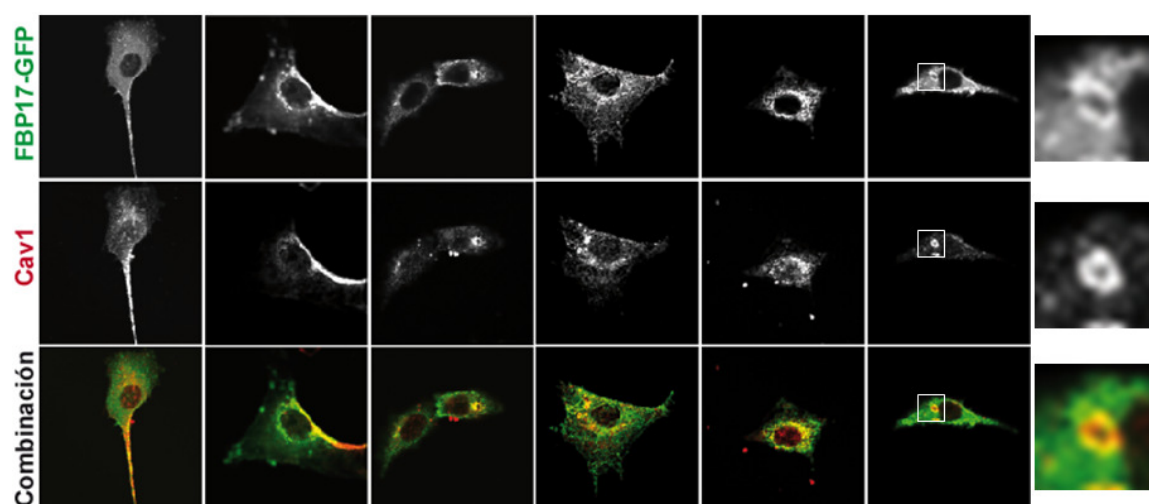
**Figura 24: Efecto de FBP17 y SDPR sobre la internalización de Cav1-GFP.** (A) Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con ARNi de FBP17 y se mantuvieron en suspensión tras 48 horas de la transfección. Se muestra el WB del silenciamiento de FBP17 y la gráfica de la cuantificación de las células con Cav1-GFP perinuclear. \*\*\* $p=0.0004$  (n=4). (B) Mismos experimentos que en “A” usando cavina-2 como proteína diana. \*\* $p=0.0041$  (n=3). Las células se mantuvieron en suspensión durante 1h, luego se fijaron y se analizó la localización de Cav1-GFP por microscopía de fluorescencia. Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student.

En conjunto, estos resultados permiten la identificación de un número importante de proteínas potencialmente implicadas en la regulación de la internalización de Cav1 que pertenecen a diferentes categorías de proteínas funcionalmente relacionadas con el tráfico vesicular. Sin embargo, para aseverar la participación real de cada uno de ellos sería necesario un análisis más detallado. Se procedió así, en base a las evidencias descritas en la literatura acerca de los diferentes candidatos que dieron resultado positivo, a analizar de forma más exhaustiva las proteínas FBP17, la combinación de c-Abl y Arg, y FLNa.

### 4.3. Validación de la regulación de la internalización de Cav1 por las proteínas FBP17, mDia1 y c-Abl/Arg

#### 4.3.1. Distribución de Cav1 en respuesta a la sobreexpresión de FBP17

Como se comentó anteriormente, las proteínas con dominio BAR determinan la función, localización y tipo de estructura de membrana plasmática (Frost y col., 2008). En el caso de FBP17, las estructuras de membranas inducidas consisten en invaginaciones tubulares (Lee y Domínguez, 2010). Distintas moléculas de carga, como la transferrina, el factor de crecimiento epidérmico y la toxina colérica, colocalizan con las invaginaciones tubulares de FBP17, y que estas invaginaciones están implicadas en procesos de internalización mediados por Dyn2, tanto dependientes como independientes de clatrina (Kamioka y col., 2004).



**Figura 25: Distribución de Cav1 endógena en fibroblastos de ratón transfectados con FBP17-GFP.** Los fibroblastos de ratón se transfectaron con un plásmido de expresión de FBP17-GFP. Transcurridas 48 horas desde la transfección, las células se fijaron y luego se tiñó la Cav1 endógena cuya distribución se analizó por microscopía de fluorescencia. Se muestra la magnificación de una región con un anillo de Cav1 y FBP17.

Puesto que los resultados mostrados en el apartado anterior sugieren que FBP17 está regulando la internalización de Cav1, se analizó si ésta pudiera colocalizar con las invaginaciones tubulares de membrana inducidas por FBP17. Tras transfectar fibroblastos de ratón con una construcción FBP17-GFP se analizó la localización de Cav1 endógena por inmunofluorescencia. FBP17-GFP se distribuyó en estructuras tubulares, prolongaciones celulares o estructuras en anillo, posiblemente correspondientes a túbulos cortados transversalmente por el plano confocal. Si bien la distribución de Cav1 en los túbulos longitudinales no fue muy evidente sí se observó una clara redistribución de Cav1 en las zonas donde FBP17-GFP se encontraba enriquecida en la

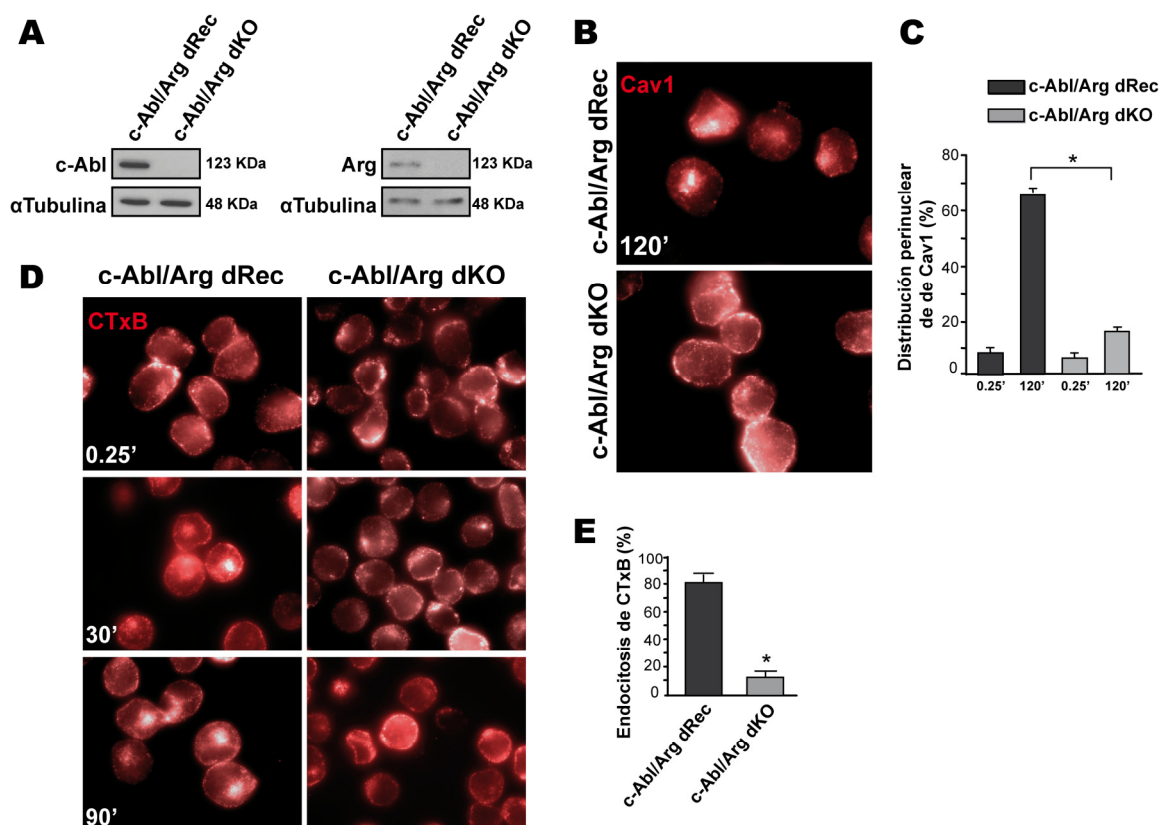
proximidad de la membrana plasmática así como una clara colocalización entre ambas estructuras en los anillos anteriormente mencionados (Figura 25).

Esta observación, junto con el efecto observado tras la inhibición de la función de FBP17 descrita anteriormente (Figura 24A), permite proponer a esta proteína como un potencial regulador de las caveolas cuyo estudio sería interesante desarrollar en mayor profundidad.

#### **4.3.2. Internalización de Cav1 y CTxB en fibroblastos c-Abl/Arg dKO y dRec**

Las siguientes proteínas en las que se centró el estudio fueron las proteínas tirosina quinasas no receptoras c-Abl y Arg. En primer lugar, y para confirmar el efecto observado con los ARNi, se estudió el efecto de la ausencia de c-Abl y Arg en la internalización de Cav1 en otro sistema celular. Para ello, se usaron fibroblastos de ratón deficientes para ambas proteínas, c-Abl y Arg (c-Abl/Arg dKO) y de estas mismas células reconstituidas con c-Abl y Arg (c-Abl/Arg dRec) (Figura 26A). Tras mantener las células c-Abl/Arg dKO en suspensión durante 2 horas, sólo una pequeña proporción de la Cav1 endógena desapareció de la membrana plasmática para localizarse en el interior celular, al contrario de lo observado en las células c-Abl/Arg dRec y en fibroblastos WT, donde la mayor proporción de caveolina se localizó en el compartimento de reciclaje (Figura 26B,C y datos no mostrados).

Para corroborar este resultado se analizó la entrada de una molécula de carga. La toxina colérica se une al gangliósido GM1 y es una de las pocas moléculas carga, identificada hasta el momento, que entra vía caveolas (Parton, 1994). Aunque también puede endocitarse por otras rutas adicionales (Howes y col., 2010) se ha demostrado que, tras la pérdida de adhesión celular, lo hace preferentemente por caveolas (Balasubramanian y col., 2007; del Pozo y col., 2005). Para estos experimentos se trabajó con la subunidad B de la toxina colérica (CTxB), que posee la capacidad de unirse al receptor pero no de generar toxicidad (Gill, 1976). En los momentos iniciales de la suspensión, la CTxB se localizó en la membrana plasmática, pero se fue internalizando conforme avanzó el tiempo de suspensión en las células que expresan c-Abl y Arg. En consonancia con los resultados presentados anteriormente, tras 90 min. de suspensión, un 80% de células c-Abl/Arg dRec presentó CTxB endocitada, en comparación con sólo un 15% en el caso de las células c-Abl/Arg dKO (Figuras 26D,E).



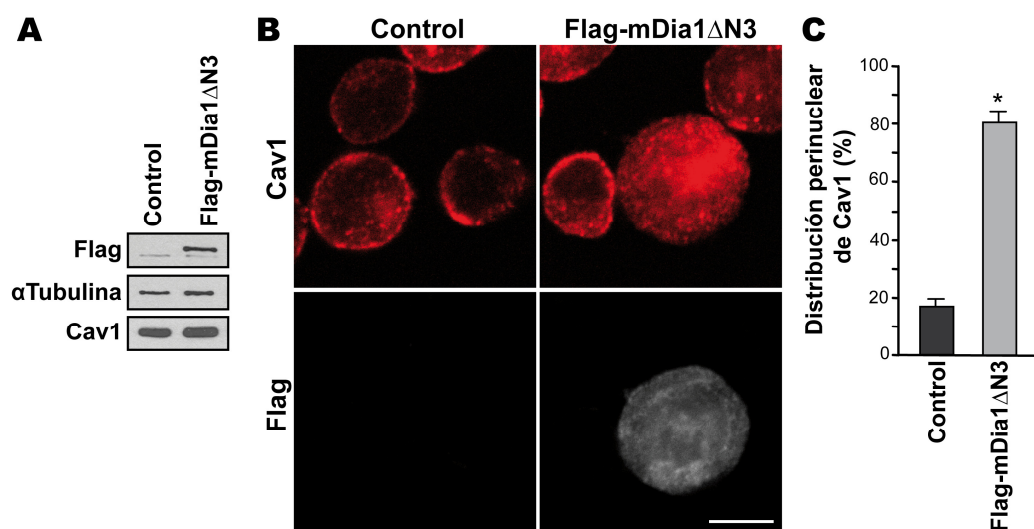
**Figura 26: c-Abl y Arg son necesarias para la internalización de Cav1 endógena y de CTxB en fibroblastos de ratón.** (A) WB de extractos de fibroblastos dRec y dKO. Los WB se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra c-Abl o con un anticuerpo policlonal contra Arg. La proteína  $\alpha$ -tubulina se usó como control de carga. (B) Los fibroblastos de ratón dRec y dKO para c-Abl y Arg se mantuvieron en suspensión durante 2 horas, se fijaron, permeabilizaron y se tiñó Cav1 endógena. (C) Cuantificación de células con Cav1 internalizada.  $***p=1 \times 10^{-5}$  (n=3). (D) Los fibroblastos de ratón dRec y dKO para c-Abl y Arg se incubaron 30' a 4°C con CTxB (1  $\mu$ g/ml), tras lavar con PBS se pusieron en suspensión durante los tiempos indicados y se fijaron. (E) Cuantificación de células con CTxB internalizada.  $**p=0.006$  (n=2). Todas las imágenes se analizaron al microscopio de fluorescencia. Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student.

#### 4.3.3. Rescate de la internalización de Cav1 por mDia1 en las células Abl/Arg dKO

Para investigar la forma en que c-Abl y Arg regulan la internalización de Cav1 en suspensión se exploró la posible existencia de una ruta con la participación de otros efectores de c-Abl. Entre éstos se tuvieron en consideración los testados en el apartado 4.2 de esta Tesis. Sin embargo, hubo que descartar a CTTN, N-WASP, Abi1+2 y al complejo Arp2/3 debido a que su silenciamiento no afectó negativamente la internalización de Cav1 (Figura 21A,B,D). Se decidió así centrar el estudio en los reguladores de actina de la familia de las forminas ya que, además, se ha observado en *D. melanogaster* que mutaciones en Diaphanous pueden alterar el fenotipo mutante de Abl (Grevengoed y col., 2003). Aunque ni el silenciamiento de mDia2 ni el de formina-1 tuvieron efectos significativos en la internalización de Cav1-GFP, sí se observó un defecto en la internalización tras el silenciamiento de mDia1 en niveles similares a los observados tras el silenciamiento de c-Abl/Arg (Figura 21C,22C). Se exploró así si las proteínas c-Abl, Arg y

mDia1 estaban regulando el proceso de internalización de caveolas mediante una ruta común. Para ello, se estudió si la forma de mDia1 mutada que actúa como dominante constitutivamente activo (mDia1 $\Delta$ N3) (ver Materiales y Métodos) era capaz de restaurar la internalización en los fibroblastos c-Abl/Arg dKO. Estas células se infectaron con retrovirus de forma que expresasen el mutante mDia1 $\Delta$ N3 de forma estable (Figura 27A) y se mantuvieron 1 hora en suspensión. De acuerdo con la hipótesis planteada, aproximadamente el 80% de células c-Abl/Arg dKO infectadas con mDia1 $\Delta$ N3 presentó internalización de Cav1 endógena (Figuras 27B,C), de forma similar al nivel de internalización observado en las células c-Abl/Arg dRec (Figura 26C). En cambio, la internalización de Cav1 en las células infectadas con el plásmido control fue similar al mostrado por las células c-Abl/Arg dKO (Figura 27B,C). Se observó también que un ~20% de células expresando mDia1 $\Delta$ N3 mostraron internalización de Cav1 inmediatamente tras la pérdida de adhesión celular, sugiriendo que una fracción de Cav1 ya estaba internalizada desde el mismo momento en que la células se levantó del sustrato.

Estos resultados sugieren que mDia1 participaría en la misma ruta de c-Abl/Arg durante la internalización de caveolas inducida por la pérdida de adhesión al sustrato, posiblemente actuando río abajo (*downstream*) de éstas.



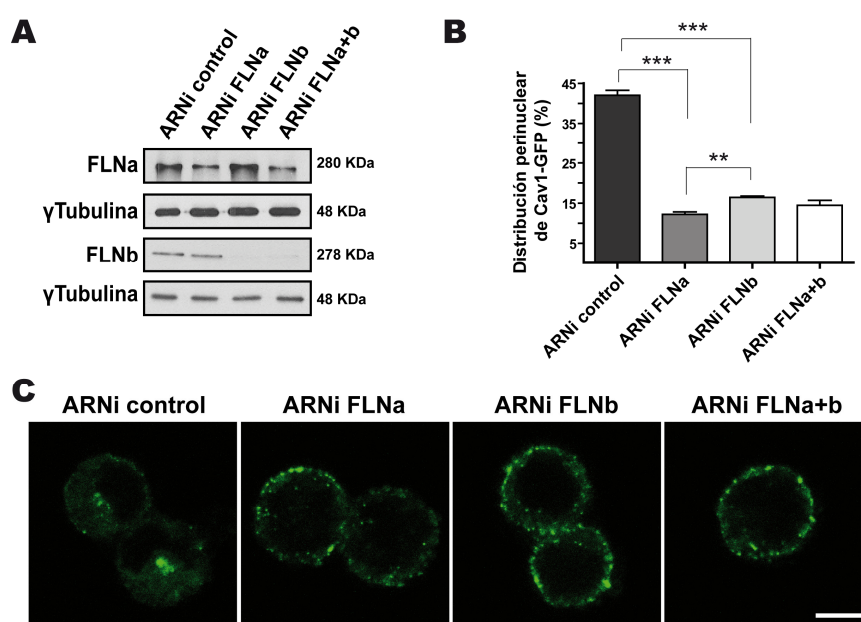
**Figura 27: La forma activa de mDia1 rescata el defecto en la internalización en células c-Abl/Arg dKO. (A)** Western blots de extractos de fibroblastos dKO infectados con plásmido control o con flag-mDia1 $\Delta$ N3. Los WB se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra Flag y con un anticuerpo policlonal contra Cav1. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga. **(B)** Los fibroblastos de ratón c-Abl /Arg dKO se infectaron con retrovirus conteniendo el mutante activado Flag-mDia1 $\Delta$ N3 o retrovirus control. Las células infectadas se pusieron en suspensión durante 0.25 o 60 min. y, tras fijarlas, se tiñó la Cav1 endógena. Barra, 10  $\mu$ m. **(C)** Cuantificación de células con Cav1 internalizada en células infectadas con el control y con el Flag-mDia1 $\Delta$ N3. \* $p=0.002$  (n=4). Todas las imágenes se analizaron al microscopio de fluorescencia. Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student.



## 4.4. Regulación de la internalización de Cav1 por las proteínas FLNa y PKC $\alpha$

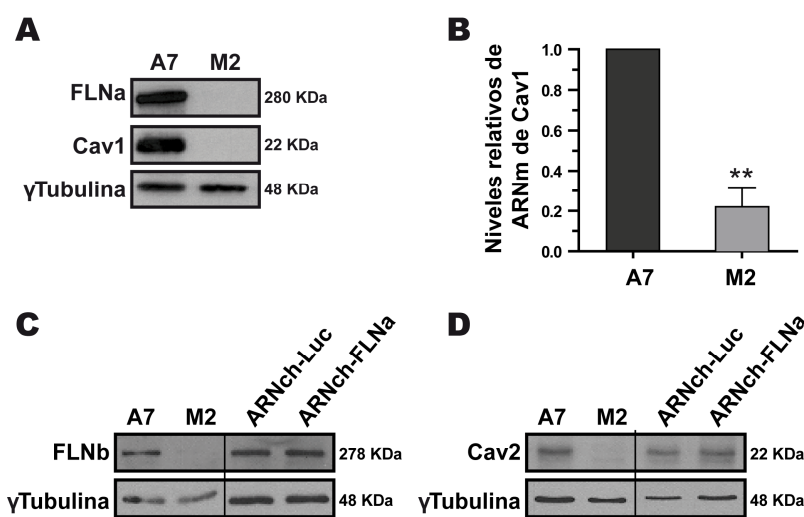
### 4.4.1. FLNa y FLNb regulan conjuntamente la internalización de Cav1

Las últimas proteínas en las que se centró este estudio, a partir de los resultados obtenidos con el abordaje de silenciamiento de proteínas candidatas, fueron las filaminas. Para estudiar si ambas isoformas regulan el proceso de internalización de forma conjunta o independiente se repitieron los experimentos de internalización induciendo el silenciamiento de dichas isoformas de forma individual o conjunta. Se observó que el silenciamiento independiente de cada una de estas proteínas no tuvo efecto sobre los niveles de expresión de la otra (Figura 28A). Sin embargo, el bloqueo de la internalización de Cav1-GFP no se incrementó tras el silenciamiento de ambas a la vez (Figura 28B,C). Estos resultados permiten postular que FLNa y FLNb trabajan de forma coordinada para la correcta regulación del proceso, o bien que ambas isoformas forman un complejo de manera que en ausencia de una de ellas, el complejo no funciona correctamente.



**Figura 28: FLNa y FLNb regulan la internalización de Cav1.** (A) El silenciamiento de FLNa o FLNb no alteró los niveles de expresión de forma recíproca. WB de extractos de células HeLa transfectadas con los ARNi de FLNa o FLNb de forma independiente o conjunta. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga. (B) Cuantificación de células mostrando Cav1-GFP internalizada tras 1 h de suspensión. \*\*\* $p$  < 0.0001 (ARNi control vs ARNi FLNa), \*\*\* $p$  < 0.0001 (ARNi control vs ARNi FLNb) y \*\* $p$  = 0.0036 (siRNA FLNa vs siRNA FLNb), (n=3). Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba  $t$  de Student. (C) El silenciamiento de FLNa y FLNb de forma independiente o conjunta resultó en la reducción de la internalización de Cav1-GFP en niveles similares. Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con los ARNi indicados (FLNa, FLNb o control). Se realizó el ensayo de suspensión tras 48 y se monitorizó la localización de Cav1-GFP a los 60 min. Barra, 7,5  $\mu$ m.

Para confirmar el efecto de las filaminas en la internalización de caveolas, se analizó la localización de Cav1 tras la pérdida de adhesión al sustrato en células de melanoma deficientes en FLNa y FLNb (M2), así como en estas mismas células reconstituidas con FLNa (A7) y que recobraron la expresión de FLNb. Estos dos tipos celulares se han establecido como un modelo de estudio de procesos regulados por FLNa ampliamente aceptado en la literatura (Cunningham y col., 1992). De forma interesante, el análisis de los niveles de proteína y de ARNm de Cav1 endógena en estas células mostró que las células M2 no presentaban niveles detectables de Cav1 ni de Cav2 endógenas aunque se desconocen las causas que subyacen a este defecto. Sin embargo, dado que en las células HeLa no se observó una regulación en los niveles de FLNb o Cav2 tras el silenciamiento de FLNa, no se profundizó en el estudio de esta regulación (Figura 28A y 29).

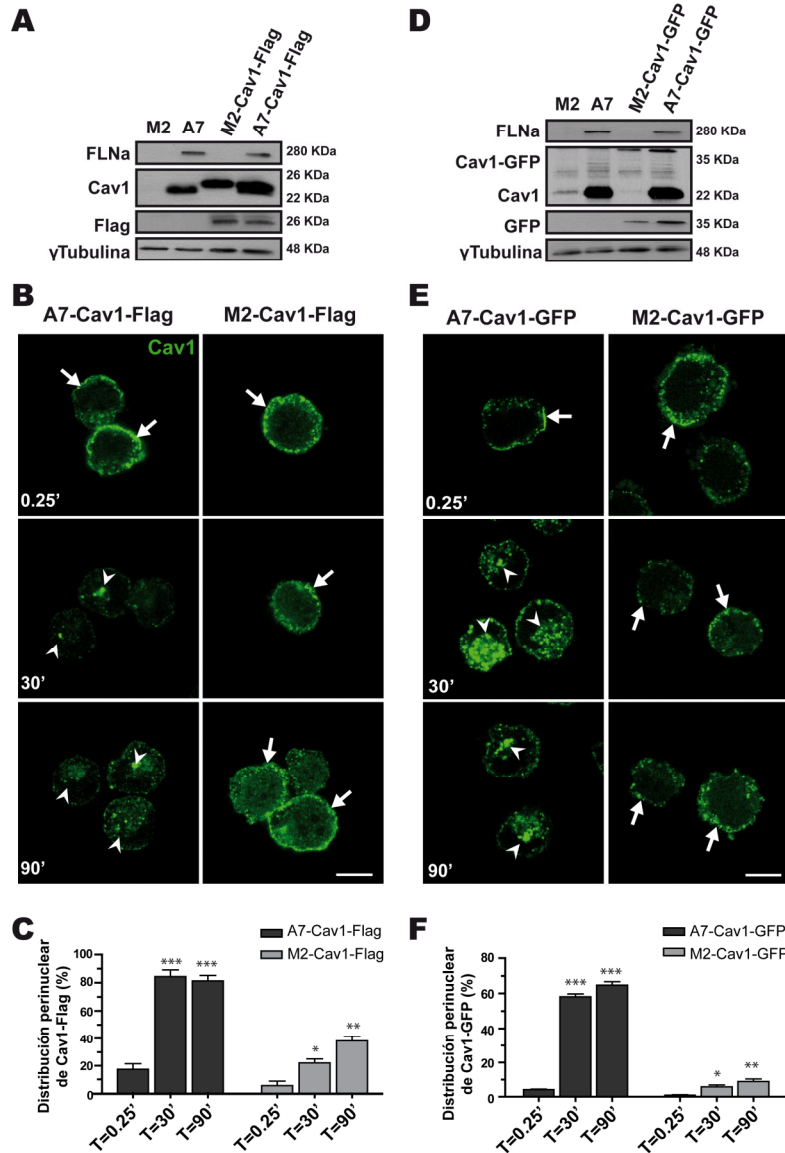


**Figura 29: Las células de melanoma deficientes en FLNa carecen de FLNb, Cav1 y Cav2.** (A) WB de extractos de células de melanoma M2 y A7 para detectar los niveles de FLNa y Cav1. (B) qPCR para detectar los niveles estacionarios de ARNm de Cav1 en las células A7 y M2, (n=4). Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student. (C) WB de extractos de células de melanoma A7 y M2, y células HeLa expresando de forma estable ARNch contra FLNa o contra luciferasa a modo de control. Los WB se incubaron con un anticuerpo contra FLNb. (D) WB a partir de los mismos extractos que en "C" incubados con un anticuerpo contra Cav2. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga en los WB.

Debido a la ausencia de Cav1 en estas células fue necesaria la expresión exógena de Cav1 para poder estudiar el tráfico de Cav1 en este sistema modelo. Para ello, se introdujo una construcción de Cav1-Flag que se expresó a niveles similares en ambas líneas celulares (Figura 30A). De esta forma se pudo comparar el comportamiento de las proteínas exógenas tanto en presencia como en ausencia de FLN. Inmediatamente tras la pérdida de adhesión de las células A7-Cav1-Flag (0.25 min) la Cav1 se localizó en su mayoría en la periferia celular, próxima a la



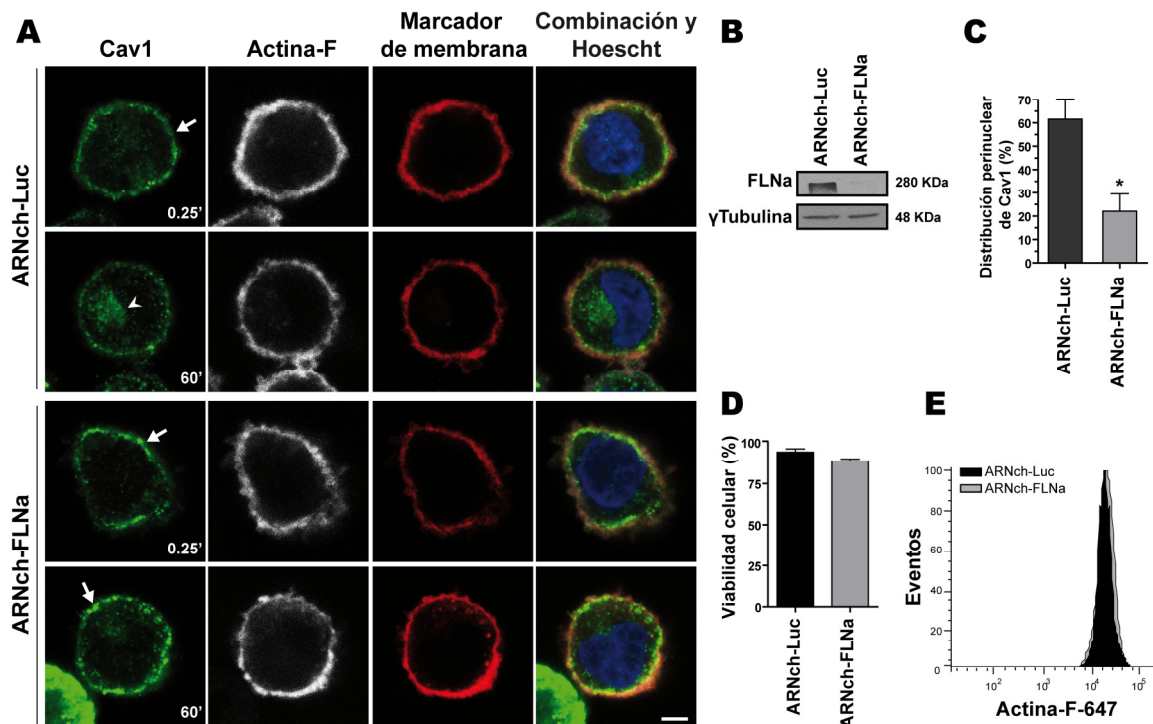
MP, mientras que a tiempos más largos de suspensión (30 y 90 min), se movilizó desde la MP y se acumuló en el compartimento perinuclear (Figura 30B,C), de acuerdo con estudios previos en otros tipos celulares (del Pozo y col., 2005). Por el contrario, tras 30 y 90 min. de suspensión la mayoría de la Cav1 permaneció en la periferia celular de las células M2-Cav1-Flag, que mostraron un porcentaje de internalización de un 70% y 50% respectivamente menor en comparación con las células A7-Cav1-Flag a estos mismos tiempos (Figura 30B,C).



**Figura 30: FLNa es necesaria para la internalización de Cav1 en las células de melanoma M2 y A7.** (A) Los WB de extractos de células M2, A7, M2-Cav1-Flag y A7-Cav1-Flag se incubaron con anticuerpos contra FLNa, Cav1 y Flag. (B) Las células A7-Cav1-Flag y M2-Cav1-Flag se mantuvieron en suspensión durante 0.25, 30 y 90 min. A continuación, se realizó inmunofluorescencia con el anticuerpo de Flag. (C) Cuantificación de células mostrando Cav1-Flag perinuclear. \*\*\* $p = 0.0004$  (A7-Cav1-Flag T=0.25 min vs A7-Cav1-Flag T=30 min), \*\*\* $p = 0.0003$  (A7-Cav1-Flag T=0.25 min vs A7-Cav1-Flag T=90 min), \* $p = 0.0195$  (M2-Cav1-Flag T=0.25 min vs M2-Cav1-Flag T=30 min) y \*\* $p = 0.0021$  (M2-Cav1-Flag T=0.25 min vs M2-Cav1-Flag T=90 min) (n=3). (D-F) Mismos experimentos que “A-C” usando Cav1-GFP en vez de Cav1-Flag. \*\*\* $p < 0.0001$  (A7-Cav1-GFP T=0.25 min vs A7-Cav1-GFP T=30 min), \*\*\* $p < 0.0001$  (A7-Cav1-GFP T=0.25 min vs A7-Cav1-GFP T=90 min), \* $p = 0.0102$  (M2-Cav1-GFP T=0.25 min vs M2-Cav1-GFP T=30 min) y \*\* $p = 0.005$  (M2-Cav1-GFP T=0.25 min vs M2-Cav1-GFP T=90 min) (n=3). La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga. Las cabezas de flecha señalan la acumulación perinuclear de Cav1 y las flechas la Cav1 con distribución periférica. Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student. Barra, 10  $\mu$ m.

Para descartar que el resultado observado pudiese deberse a algún efecto inespecífico debido al epítipo fusionado con la proteína, se repitió el mismo procedimiento con Cav1-GFP. De igual forma que para el caso de Cav1-Flag, los niveles de expresión fueron similares en ambas líneas celulares (Figura 30D), y de nuevo se observó la correcta internalización de Cav1-GFP en las células A7 y un defecto significativo en las células M2 (Figura 30E,F). Estos resultados, junto con los obtenidos con los ARNi de FLNa y FLNb mostrados en las figuras 18C,D y 28 indican que las filaminas regulan la internalización de Cav1.

Sin embargo, dado que la isoforma A de filamina es la más abundante y ampliamente expresada en el adulto (Feng y Walsh, 2004), se decidió centrar el estudio en la FLNa. Por otro lado, puesto que hasta el momento en todos los experimentos mostrados se usó Cav1 exógena, se decidió validar la implicación de FLNa usando la Cav1 endógena. Para abordar este estudio se generó una línea celular que expresaba de forma estable un ARNch contra FLNa (HeLa-ARNch-FLNa) y otra que expresaba un ARNch contra luciferasa (HeLa-ARNch-Luc) a modo de control. Para ello, se infectaron las células HeLa con vectores lentivirales que expresaban estos ARNch. Mientras que el silenciamiento de FLNa en este sistema (Figura 31B) no afectó a la expresión de FLNb ni de Cav2 (Figura 29C,D), sí bloqueó la translocación de Cav1 endógena al compartimento perinuclear tras una hora de suspensión, con la consiguiente retención en la periferia celular, en comparación con las células control HeLa-ARNch-Luc (Figura 31A,C). Para verificar la localización precisa de la fracción de Cav1 no internalizada en relación con la MP se utilizó el plásmido pCS-memb-cherry, codificante para una forma modificada de la proteína fluorescente *cherry* dirigida a la MP (Megason y Fraser, 2003) (ver Materiales y Métodos). En consonancia con los resultados presentados hasta el momento, la fracción de Cav1 no internalizada se localizó en íntima asociación con la MP. Cabe destacar además que el marcador memb-cherry no se internalizó tras la pérdida de adhesión celular, confirmando la especificidad del proceso estudiado (Figura 31A). Para estudiar si los defectos observados en la internalización de Cav1 en ausencia de FLNa pudieran deberse a una alteración del citoesqueleto de actina durante la suspensión, se analizó la distribución y cantidad de actina-F mediante microscopía de fluorescencia y FACS respectivamente (Figura 31A,E). No se observaron diferencias significativas en estas mediciones entre las células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa (Figura 31A,E). Asimismo, el análisis de la viabilidad celular, midiendo la incorporación de yoduro de propidio por citometría de flujo, tras el tiempo de suspensión tampoco mostró diferencias significativas entre ambos tipos celulares (Figura 31D).

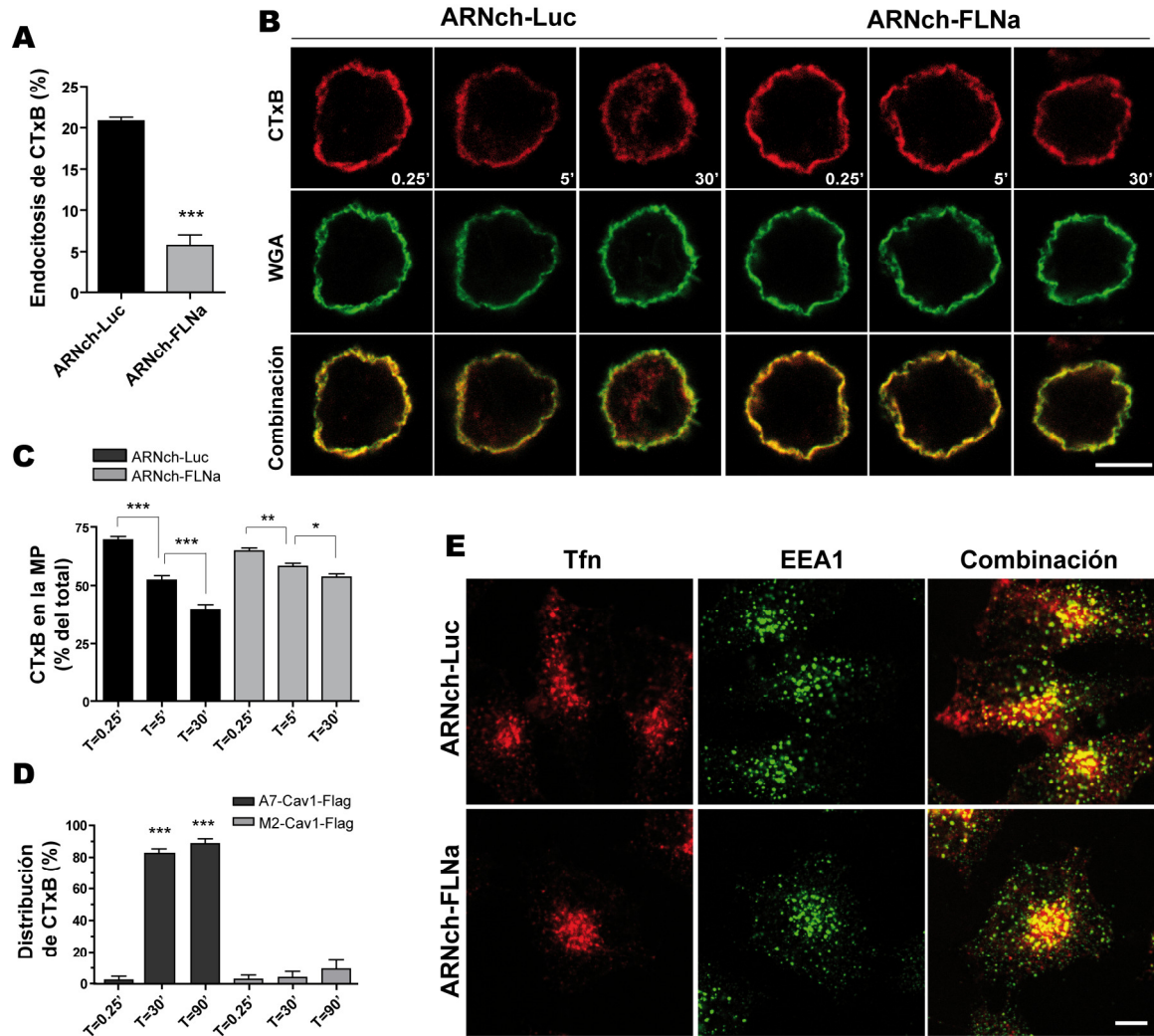


**Figura 31: FLNa regula la internalización de Cav1 endógena.** (A) Las células HeLa, infectadas con ARNch-Luc o ARNch-FLNa se mantuvieron en suspensión y, tras 0.25 ó 60 min., se fijaron. Tras la permeabilización se realizó la inmunofluorescencia de Cav1. Las flechas y las cabezas de flecha señalan Cav1 localizada en la periferia celular o acumulada en el interior celular, respectivamente. Barra, 5  $\mu$ m. (B) El WB muestra el efecto del ARNch sobre los niveles de FLNa. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga. (C) La internalización de Cav1 a los 60 min. de suspensión se cuantificó como el % de células con Cav1 acumulada en el interior celular. Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. \* $p=0.0262$  (n=3). Prueba *t* de Student. (D) Viabilidad celular en células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa tras 60 min. de suspensión midiendo las células que incorporan yoduro de propidio por FACS. (E) Media de la intensidad de fluorescencia en células teñidas con faloidina-Alexa-647 tras 60 min. de suspensión

Estos resultados, junto con los mostrados en las figuras 20C y 28, permitieron concluir que los defectos en la internalización de Cav1 en ausencia de FLNa son debidos a una alteración específica de este proceso.

#### 4.4.1.1. FLNa regula la entrada de CTxB y Tfn en suspensión

La retención de Cav1 en la MP inducida por el defecto en el proceso de internalización en ausencia de FLNa sugiere la implicación de esta proteína en las etapas iniciales del proceso. Para contrastar esta hipótesis, se analizó la entrada de la CTxB tras la pérdida de adhesión celular en presencia o ausencia de FLNa. Para ello, las células HeLa-ARNch-Luc y HeLa-ARNch-FLNa se mantuvieron en suspensión durante 30 min. y, transcurrido este tiempo, se incubaron con CTxB a fin de detectar la cantidad de GM1 restante en la MP (ver Materiales y Métodos). Tras el análisis por FACS se obtuvo que la internalización de GM1 disminuyó significativamente en ausencia de FLNa (Figura 32A).



**Figura 32: FLNa regula la internalización de CTxB.** (A) Las células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa se mantuvieron en suspensión durante 30 min. para permitir la internalización de los dominios de MP enriquecidos en GM1. Seguidamente se incubaron con CTxB conjugada con Alexa-647, cuya señal se detectó por FACS. \*\*\* $p=0.0004$  ( $n=3$ ); (B) Las células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa se incubaron con CTxB-647 a 4°C y luego se mantuvieron en suspensión durante los tiempos indicados. El WGA-488 se usó como marcador de MP. Barra, 10  $\mu$ m. (C) Cuantificación de la señal de CTxB en la MP tras 1 hora de suspensión, relativizada a la señal total, a partir de imágenes como las de “B” (ver Materiales y Métodos). \*\*\* $p<0.0001$  (ARNch-Luc T=0 min. sv T=5 min.), \*\*\* $p=0.0001$  (ARNch-Luc T=5 min. vs T=30 min.), \*\* $p=0.0014$  (shFLNa T=0 min vs T=5 min) y \* $p=0.0271$  (shFLNa T=5 min vs T=30 min). (D) Las células M2 y A7 expresando Cav1-Flag se incubaron con CTxB de la misma manera que las células de “B” y se mantuvieron en suspensión durante los tiempos indicados. Se contaron las células con señal perinuclear de CTxB. \*\*\* $p<0.0001$  (A7-Cav1-Flag T=0.25 min vs A7-Cav1-Flag T=30) y \*\*\* $p<0.0001$  (A7-Cav1-Flag T=0.25 min vs A7-Cav1-Flag T=90); ( $n=3$ ). (E) FLNa no es necesaria para la endocitosis de TfR en adhesión. Las células HeLa, infectadas con ARNch-Luc o ARNch-FLNa se incubaron con TfR-TxRed durante 15 min. en adhesión. Seguidamente se fijaron y se incubaron con anticuerpo contra EEA1. La TfR se acumuló en el interior celular en ambos casos. Barra, 7.5  $\mu$ m. Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student.

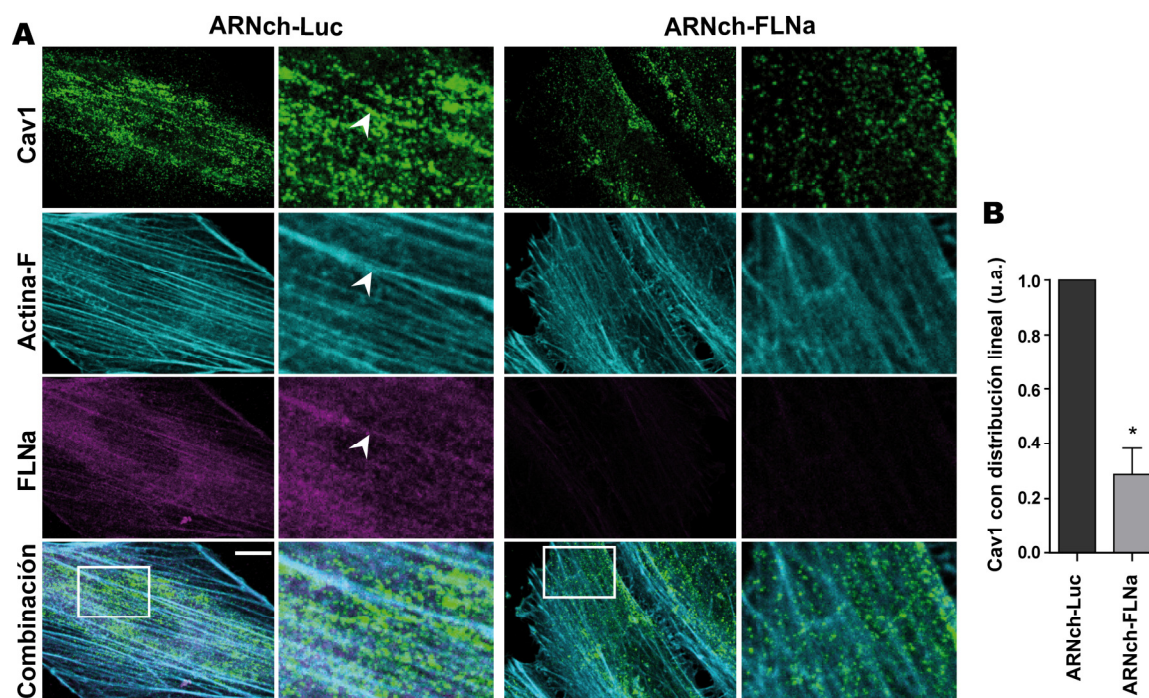
Por otra parte, se analizó la cinética de internalización de caveolas tras distintos tiempos de suspensión utilizando CTxB como marcador. En estos experimentos las células se incubaron con dicha toxina durante la fase de adhesión y se midieron sus niveles en la MP a distintos tiempos de suspensión por inmunofluorescencia (ver Material y Métodos). De esta forma, en las células control, la señal de CTxB en la MP disminuyó progresivamente tras la pérdida de adhesión celular, debido a su acumulación en el interior de la célula (Figura 32B,C). Además, en consonancia con los resultados presentados anteriormente, se observó un retraso significativo en el proceso de internalización de la CTxB en las células HeLa-ARNch-FLNa (Figura 32B,C). Estos defectos se observaron también cuando se estudió la endocitosis de CTxB en las células M2 y A7 utilizando la misma aproximación experimental (Figura 32D).

Para analizar si el efecto del silenciamiento de FLNa en la internalización de caveolas es específico o si, por el contrario, pudiese estar regulando otras vías de entrada independientes de Cav1, se midió la endocitosis mediada por clatrina mediante la monitorización de la internalización de transferrina (Tfn), ligando clásico para el estudio de esta vía de endocitosis (Kumari y col., 2010). Para ello las células HeLa-ARNch-Luc y HeLa-ARNch-FLNa se incubaron con Tfn-TxRed durante 15 minutos en adhesión y posteriormente se analizó la localización de dicha molécula, observando que la disminución de FLNa no afectó a la internalización de Tfn (Figura 32E). Estos resultados sugieren que la FLNa regula específicamente los primeros pasos de la entrada de CTxB y, por consiguiente, de la internalización de Cav1.

#### **4.4.2. FLNa regula la distribución de Cav1 sobre las fibras de estrés en adhesión**

Tras la activación de RhoA, las vesículas de Cav1 adoptan una distribución lineal, coalineándose con las fibras de actina en pequeñas áreas donde se localiza FLNa (Stahlhut y van Deurs, 2000). Para averiguar si FLNa es necesaria para establecer y/o mantener esta distribución, se analizaron estas estructuras lineales de Cav1 endógena en células HeLa-ARNch-FLNa en adhesión frente a las células control HeLa-ARNch-Luc. En las células control se pudo identificar de forma clara, mediante inmunofluorescencia la distribución lineal de Cav1 sobre las fibras de actina y FLNa (Figura 33A). Sin embargo, dicha distribución fue menos evidente en las células HeLa-ARNch-FLNa, observándose una reducción significativa en la proporción de células que presentaron una disposición lineal de Cav1 (Figura 33A,B).

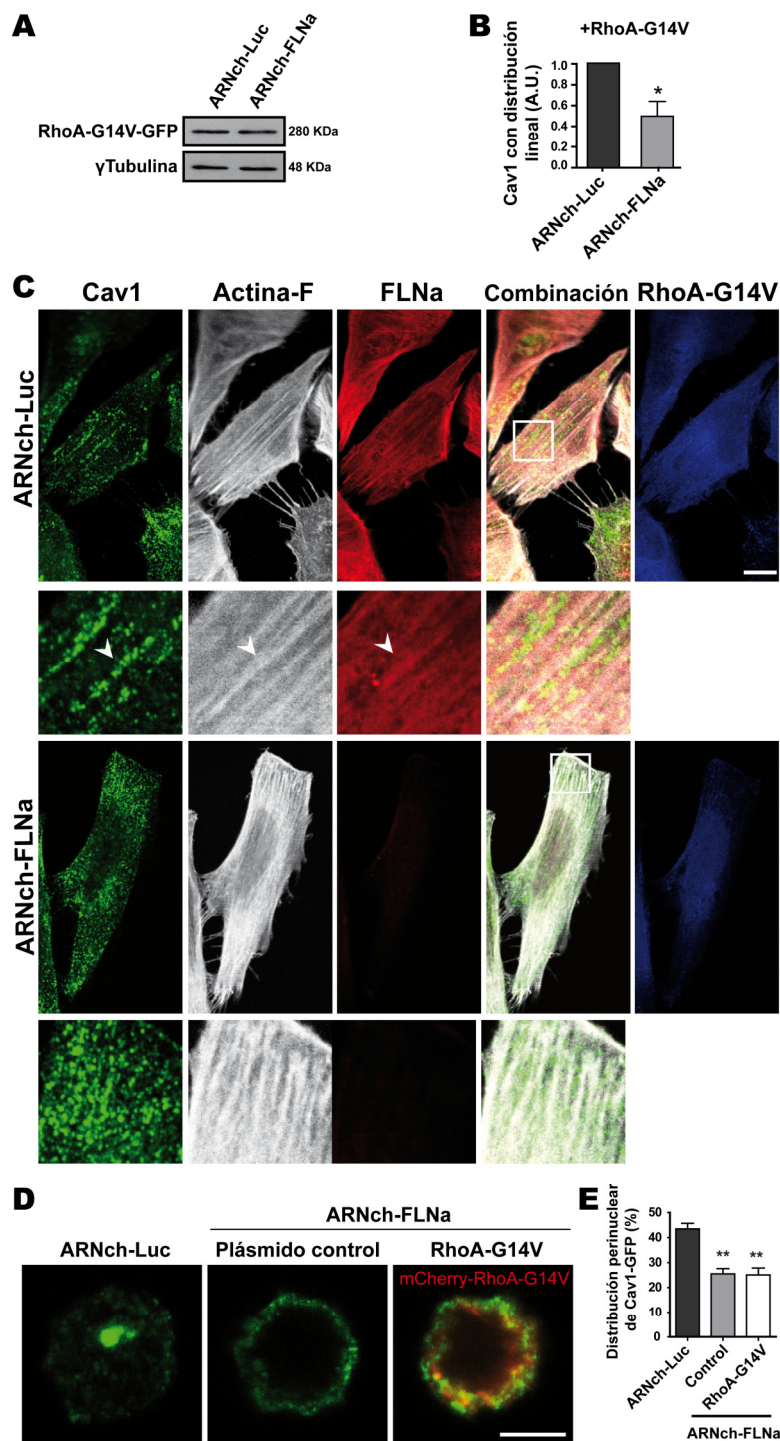




**Figura 33: FLNa regula la distribución de las vesículas de Cav1 alineadas sobre las fibras de estrés.** (A) Las células HeLa-ARNch-Luc y HeLa-ARNch-FLNa se incubaron con anticuerpos contra Cav1 y FLNa y con faloidina-Alexa-647. Las cabezas de flecha señalan un grupo de vesículas de Cav1 alineadas con un filamento de actina y con la tinción de FLNa en las células control (HeLa-ARNch-Luc). Barra, 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación de imágenes obtenidas de experimentos como el del panel “A” (ver Materiales y Métodos). \* $p=0.0171$  (n=3). Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student. u.a.: unidades arbitrarias.

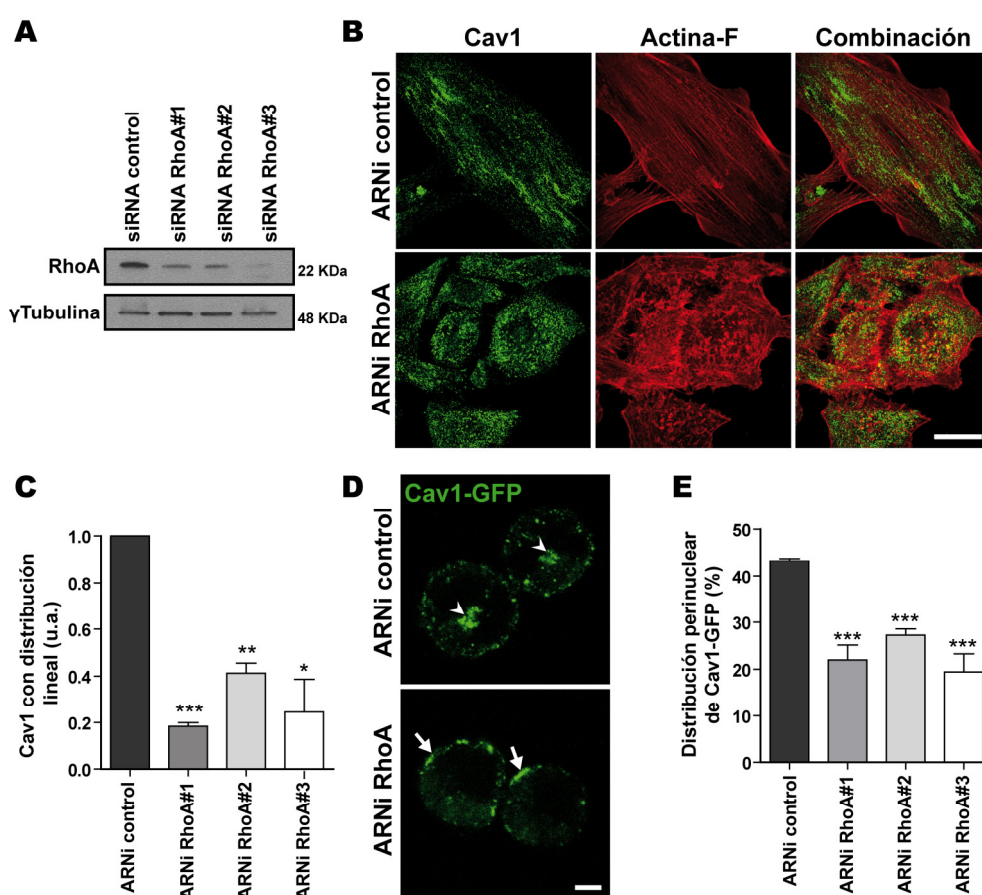
Se ha descrito que la supresión de FLNa no afecta de forma dramática a la estructura del citoesqueleto de actina ni a la disposición de las fibras de estrés (Baldassarre y col., 2009; Feng y col., 2006; Sverdllov y col., 2009). Sin embargo, aunque las células HeLa-ARNch-FLNa, no mostraron alteraciones en el citoesqueleto de actina en suspensión (Figura 31A,E), sí se observaron diferencias en las fibras de estrés entre las células HeLa-ARNch-Luc y las HeLa-ARNch-FLNa en condiciones adherentes (Figura 33A). Por tanto, con el fin de descartar un posible efecto del silenciamiento de FLNa en la dinámica de actina dependiente de RhoA, se sobreexpresó, en las líneas celulares anteriormente empleadas, una forma constitutivamente activa de RhoA (RhoA-G14V) (Figura 34A).

La expresión de RhoA-G14V resultó en el aumento de la distribución de Cav1 endógena alineada sobre las fibras de estrés en ambas líneas celulares (no mostrado); sin embargo, la cantidad de Cav1 lineal continuó siendo menor en las células sin FLNa (Figura 34B,C), lo que indica que las alteraciones en las fibras de estrés no pueden justificar el defecto observado en la distribución de Cav1 tras el silenciamiento de FLNa. En consonancia con estas observaciones, la sobreexpresión de RhoA-G14V no pudo rescatar el defecto de internalización de Cav1-GFP observado en las células HeLa-ARNch-FLNa (Figura 34D,E).



**Figura 34: FLNa regula la distribución de las vesículas de Cav1 alineadas sobre las fibras de estrés.** (A) WB mostrando los niveles similares de GFP-RhoA-G14V en las células silenciadas y control. La proteína  $\gamma$ -tubulina fue usada como control de carga. (B) Las células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa se transfectaron con RhoA-G14V para estimular el alineamiento de las vesículas de Cav1 con las fibras de actina. Las cabezas de flecha señalan un grupo de vesículas de Cav1 alineadas con un filamento de actina y con la tinción de FLNa en las células control. Barra, 10  $\mu$ m (C) Cuantificación de imágenes tratadas como en “B” (ver Materiales y Métodos).  $*p=0.0231$  ( $n=5$ ). Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba  $t$  de Student. u.a.: unidades arbitrarias (D) RhoA-G14V no rescató el defecto en la internalización de Cav1-GFP de las células HeLa-ARNch-FLNa. Las imágenes confocales muestran las distribución perinuclear de Cav1 en las células HeLa-ARNch-Luc, pero no en las células ARNch-FLNa solas o expresando RhoA-G14V. Barra, 7.5  $\mu$ m. (E) Cuantificación del porcentaje de células mostrando Cav1 perinuclear.  $**p=0.0042$  (ARNch-Luc vs ARNch-FLNa) y  $**p=0.0065$  (ARNch-Luc vs ARNch-FLNa+RhoAG14V); ( $n=3$ ). Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba  $t$  de Student.

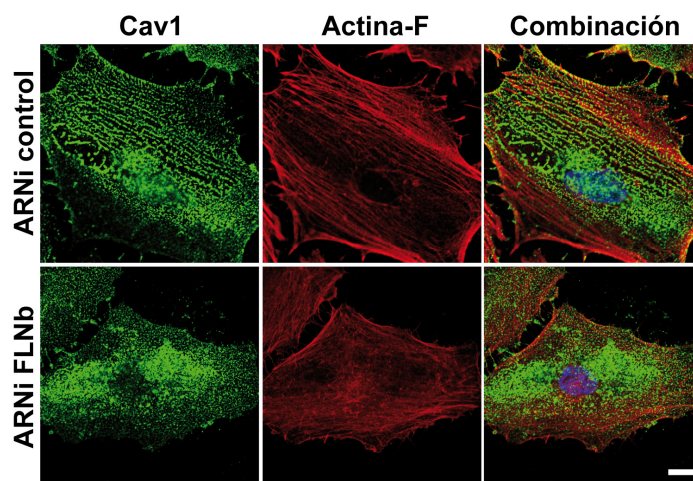
Para corroborar que la distribución lineal de Cav1 requiere la participación del citoesqueleto de actina, se analizó la distribución de Cav1 endógena en células HeLa silenciadas para RhoA (Figura 35A). El silenciamiento de RhoA causó una llamativa alteración del citoesqueleto de actina, con una reducción en el número de fibras de estrés y en la distribución lineal de Cav1 endógena (Figura 35B,C). Asimismo, el silenciamiento de RhoA resultó en defectos en la internalización de Cav1 de las células HeLa-Cav1-GFP en condiciones de pérdida de adhesión al sustrato (Figura 35D,E). En conjunto, estos resultados sugieren que podría existir una relación entre la distribución lineal y la internalización de Cav1. Los tres oligonucleótidos de ARNi contra RhoA usados dieron resultados similares minimizando, por tanto, la probabilidad de que el fenotipo se debiese a un efecto inespecífico.



**Figura 35: RhoA es necesaria para mantener la distribución lineal de Cav1 y para su endocitosis.** (A) WB de extractos celulares para analizar el efecto del ARNi sobre los niveles de la proteína diana. (B) El silenciamiento de RhoA mediante ARNi reduce la distribución lineal de Cav1 coalineada con las fibras de actina. Las células HeLa se transfectaron con ARNi de RhoA o control. Tras 48 horas se fijaron y se analizó la distribución lineal de Cav1. Barra, 25µm. (C) Cuantificación de la distribución lineal de Cav1 (ver Materiales y Métodos) \*\*\* $p=0.0004$  (ARNi control vs ARNi RhoA#1), \*\* $p=0.0053$  (ARNi control vs ARNi RhoA#2) and \* $p=0.0335$  (ARNi control vs ARNi RhoA#3 (n=3). (D) RhoA es necesaria para la internalización de Cav1. Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con los ARNi de RhoA o control. Transcurridas 48 horas desde la transfección, las células se pusieron en suspensión durante 1 hora y a continuación se fijaron. Las cabezas de flechas muestran la distribución perinuclear de Cav1 y las flechas muestran la distribución de Cav1 en la periferia. Barra, 5 µm (E) Cuantificación de células con distribución perinuclear de Cav1-GFP tras los distintos tratamientos \*\*\* $p=0.0006$  (ARNi control vs ARNi RhoA#1; n=4), \*\*\* $p<0.0001$  (ARNi control vs ARNi RhoA#2, n=3) y \*\*\* $p=0.0009$  (ARNi control vs ARNi RhoA #3, n=3). Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba  $t$  de Student. u.a.: unidades arbitrarias



Por otro lado, también se observó un efecto de FLNb en la regulación de la distribución lineal de Cav1 (Figura 36), de acuerdo con el efecto producido por el silenciamiento de FLNb sobre la internalización de Cav1-GFP. En conjunto, estos datos sugieren que la FLNa y FLNb actúan como elementos de conexión entre la Cav1 y las fibras de actina permitiendo a las vesículas de Cav1 distribuirse en la localización requerida para inducir la internalización adecuada de caveolas y su tráfico hacia el interior celular tras la pérdida de adhesión al sustrato.

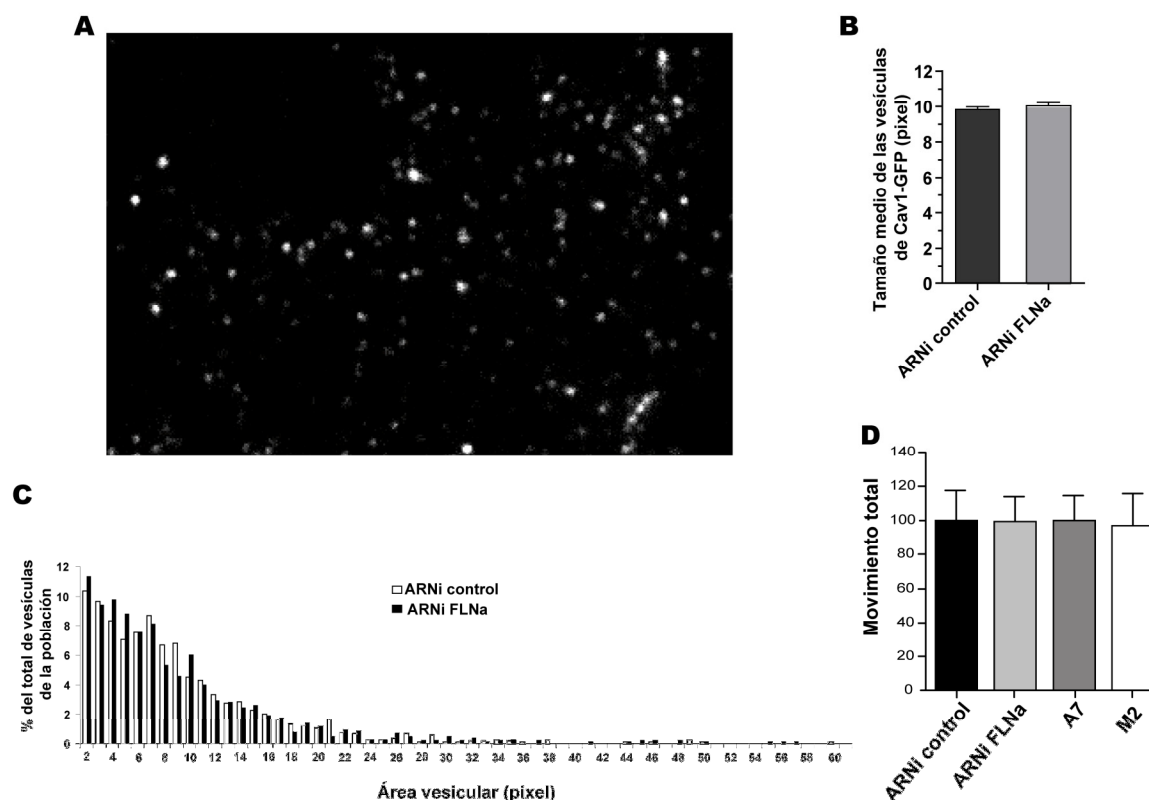


**Figura 36: FLNb regula la distribución lineal de Cav1.** El silenciamiento de FLNb mediante ARNi reduce la distribución lineal de Cav1 coalineada con las fibras de actina. Las células HeLa se transfectaron con ARNi de FLNb o control. Tras 48 horas se fijaron y se analizó la distribución lineal de Cav1.

#### 4.4.3. FLNa regula el anclaje de las vesículas de Cav1-GFP a la MP basal

Para entender cómo FLNa regula la distribución lineal de Cav1, se probó el efecto que la eliminación de FLNa tenía sobre las vesículas de Cav1 cercanas a la MP mediante microscopía TIRF (TIRFm). La profundidad de penetración del TIRFm permitió estudiar específicamente las vesículas de Cav1-GFP cercanas a la MP basal. Para restringir el análisis específicamente a vesículas, descartando agregados vesiculares, se fijó la profundidad de TIRFm en 90 nm. Esta longitud se asemeja al diámetro de una vesícula de caveola (100 nm aproximadamente) por lo que cualquier acumulación de Cav1-GFP contenida en este plano debe corresponderse con vesículas (Figura 37A). Además, la distribución del tamaño, analizada de forma similar a lo descrito por el Dr. Pelkmans (Pelkmans y Zerial, 2005) (Figura 37C), se corresponde con la característica de vesículas no agregadas. El análisis se centró en las vesículas que aparecieron como puntos bien separados (video-microscopía 2 y 3. Anexo I) y que permanecieron en la capa de 90nm durante prácticamente la totalidad de la duración de la película (2 min aproximadamente). Con estos criterios se analizaron secuencias de 1000 imágenes de células en adhesión, excluyéndose las vesículas completamente internalizadas, las citoplásmicas y las que se encontrasen en proceso de reciclaje. Este análisis no mostró efectos del silenciamiento de FLNa sobre el tamaño vesicular

promedio ni sobre la distribución de poblaciones de tamaño (Figura 37B,C). Como primera aproximación se analizó el cambio total en la presencia de vesículas contenidas en el plano TIRF mediante la sustracción de fotogramas consecutivos de las películas de TIRFm durante períodos de 30 s (ver Materiales y Métodos). El resultado de este análisis sugirió que la dinámica de las vesículas de Cav1 a lo largo de estos periodos de tiempo era similar en presencia o ausencia de FLNa (Figura 37D).



**Figura 37: El tamaño y movimiento de las vesículas de Cav1 en la membrana plasmática durante largos periodos de tiempo es insensible a la ausencia de FLNa.** (A) Imagen representativa de una célula HeLa-Cav1-GFP observada por TIRFm a 90 nm de profundidad. (B) Media del área (pixels) de las vesículas de Cav1-GFP en células HeLa expresando de forma transitoria ARNi control o ARNi contra FLNa. (C) FLNa no influye en el tamaño de las vesículas de Cav1-GFP localizadas en la MP. El histograma muestra la distribución de las vesículas de Cav1-GFP según su área en células control y células FLNa KD de un experimento representativo. (D) Cuantificación del cambio total en la presencia de vesículas de Cav1-GFP a partir de películas realizadas con TIRF-m en células HeLa control o FLNa KD de forma transitoria y en células de melanoma humano deficientes en FLNa (M2) y reconstituidas con FLNa (A7). El cambio total en la presencia de vesículas de Cav1-GFP (representado como el área total de la máscara creada a partir de la imagen resultante de hacer la proyección Z de un Delta-up) se cuantificó de la manera indicada en Materiales y Métodos y publicada (Sverdlov, 2009 #4151). Las películas contuvieron 400 fotogramas, adquiridos cada 300 milisegundos. Los datos de los histogramas se

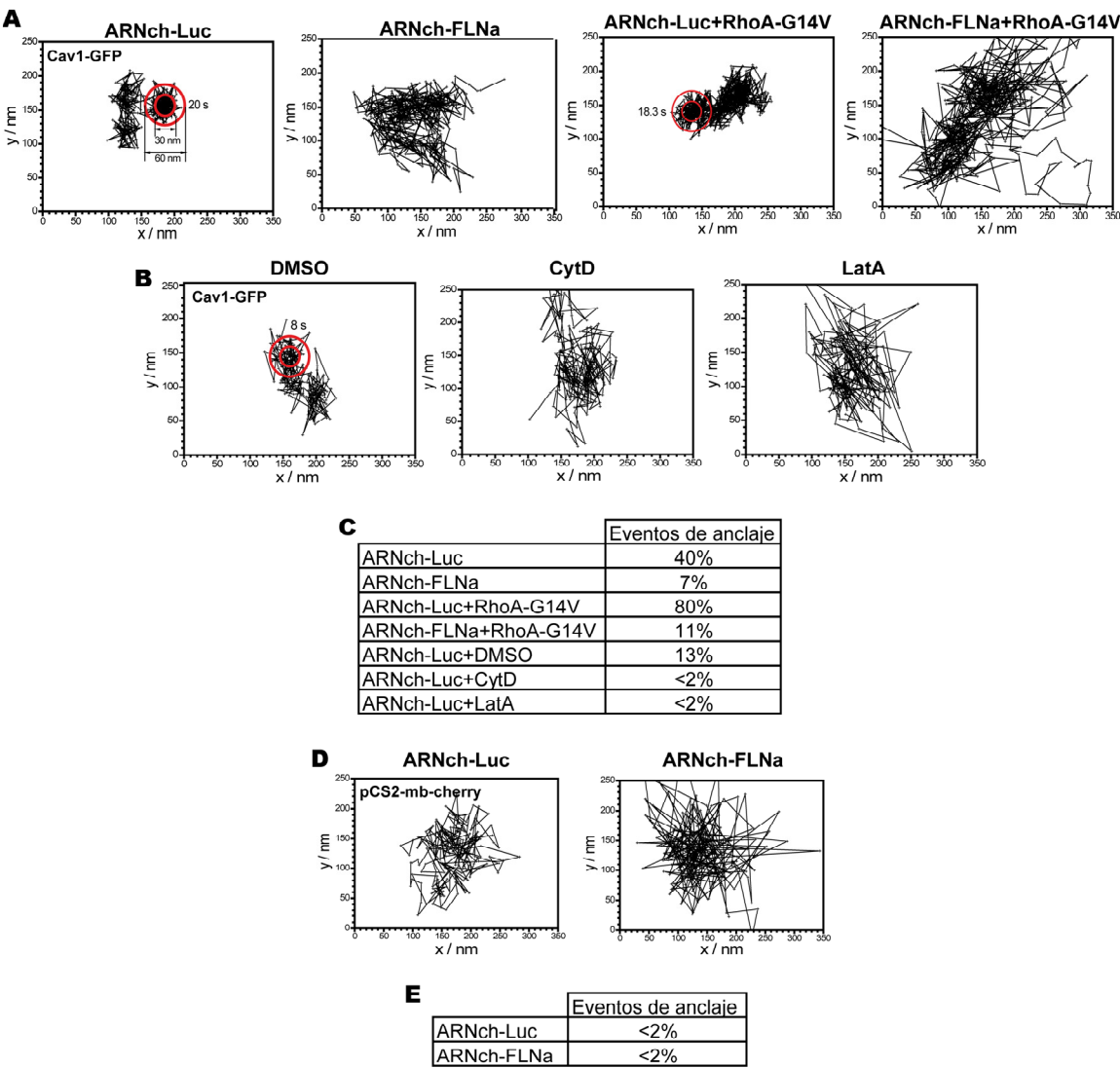
Sin embargo, para descartar que la ausencia de diferencias fuese debida a la falta de resolución espacio-temporal del sistema de medida empleado se decidió estudiar el movimiento lateral de las vesículas de forma más precisa, utilizando una aproximación de seguimiento de la trayectoria de partículas individuales (*single-particle tracking*), previamente descrita en otros sistemas experimentales (Saxton y Jacobson, 1997), a fin de monitorizar la trayectoria de

vesículas individuales de Cav1-GFP en células HeLaARNch-FLNa y ARNch-Luc. Este tipo de análisis mostró que el ~97% de las vesículas analizadas en las células control era estable, mostrando poco movimiento en cortas distancias, con el ~3% restante mostrando movimientos de larga distancia y direccionales, probablemente correspondientes a procesos de transporte vesicular activo (video-microscopía 2 y 3. Anexo I). Esta observación concuerda con otras previas obtenidas usando FRAP (Thomsen y col., 2002), TIRFm (Pelkmans y Zerial, 2005; Sverdllov y col., 2009; Tagawa y col., 2005) y microscopía confocal de *spinning disc* (McMahon y col., 2009). La principal diferencia entre las células ARNch-FLNa y ARNch-Luc fue observada en el movimiento de las vesículas más localizadas y lentas durante escalas de tiempo cortas ( $\leq 10$  s). Los movimientos vesiculares en las células control (ARNch-Luc) fueron más restringidos, con muchas vesículas que permanecieron inmóviles dentro de una posición concreta (30 nm de diámetro medio) durante períodos de 5 a 10 s. Para cuantificar esta observación, definimos un evento de anclaje como la movilidad limitada dentro de un radio de 30 nm durante un tiempo mínimo de 4.7 s (ver Materiales y Métodos). Usando este criterio, observamos que el 41% de las vesículas en las células control (ARNch-Luc) mostraron, al menos, un evento de anclaje, con el resto de vesículas siguiendo un movimiento menos restringido. Por el contrario, sólo el 7% de las vesículas de Cav1 en las células ARNch-FLNa mostraron eventos de anclaje, con la mayoría de las vesículas describiendo un movimiento aleatorio dentro de un área determinada que, en sí misma, cambió de posición debido al propio movimiento celular (Figura 37A,B).

En conclusión, el movimiento de las vesículas de Cav1-GFP en ausencia de FLNa fue esencialmente caótico, en comparación las células control, en las cuales estas vesículas se movieron entre puntos de anclaje. Dado que la distribución lineal de caveolas correlaciona positivamente con la actividad de RhoA, se estudió el efecto un mutante de RhoA que muestra actividad de forma constitutiva en el anclaje de las vesículas de Cav1. La expresión del mutante activo RhoA-G14V duplicó la incidencia de eventos de anclaje de Cav1 (80% de vesículas con anclaje) en las células ARNch-Luc, pero tuvo un efecto significativamente menor en el número de eventos de anclaje en las células ARNch-FLNa (11% de vesículas con anclaje) (Figura 37A,B). Por tanto, estos resultados permiten concluir que RhoA facilita el anclaje, dependiente de FLNa, de las vesículas de Cav1 en el área perimembranosa mediante la regulación de la función y estabilidad de las fibras de estrés.

Para validar la implicación del citoesqueleto de actina en el anclaje de Cav1, ya sugerido por el efecto de RhoA-G14V, se analizó el anclaje de Cav1 tras el tratamiento con CytD o LatA. Ambos compuestos redujeron el número de eventos de anclaje aproximadamente 6 veces (Figura 37C,D), confirmando la hipótesis inicial. Por último, para descartar un efecto generalizado de FLNa en el anclaje de las proteínas de membrana, se estudió el efecto del

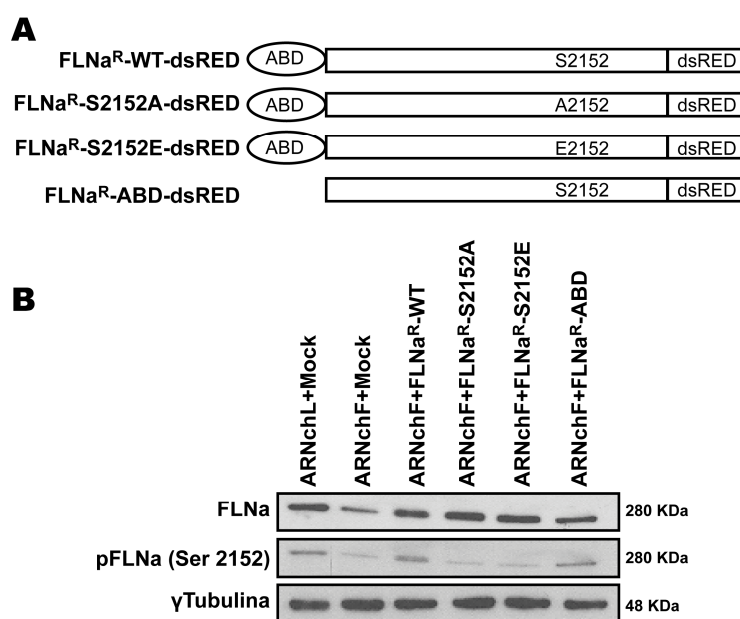
silenciamiento de FLNa en un marcador de membrana (*memb-cherry*). La dinámica de anclaje de este marcador de membrana difirió de la de Cav1, y no se vio afectada por la ausencia de FLNa, indicando que el anclaje de Cav1 dependiente de actina está específicamente regulado por FLNa (Figura 37E).



**Figura 38: El anclaje de las vesículas de Cav1 a la membrana plasmática se ve afectado específicamente por FLNa y por el citoesqueleto de actina.** (A) Trayectorias típicas de vesículas de Cav1-GFP en células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa, y en las mismas líneas celulares expresando RhoA-G14V-cherry. Las posiciones secuenciales de las vesículas fueron registradas en intervalos de 85 ms y se conectaron mediante líneas rectas. Los círculos externos muestran el umbral especial fijado para determinar un evento de anclaje (60 nm de diámetro); los círculos internos muestran el posicionamiento de las vesículas con mayor precisión (30 nm). La duración de los eventos de anclaje viene indicada en la figura. (B) Trayectorias típicas de vesículas de Cav1-GFP en células HeLa tratadas con CytD (1µM) y LatA (1µM). Un volumen equivalente de DMSO fue usado como control. (C) Porcentaje de trayectorias de Cav1-GFP mostrando eventos de anclaje para todas las condiciones. (D) Trayectorias típicas de vesículas del marcador de membrana plasmática (pCS2-memb-cherry) en células HeLa-ARNchLuc y ARNch-FLNa. (E) Porcentaje de trayectorias de pCS2-mb-cherry mostrando eventos de anclaje para las dos condiciones. Se analizaron 10-30 trayectorias por célula, 5-10 células por experimentos y 3-4 experimentos por condición.

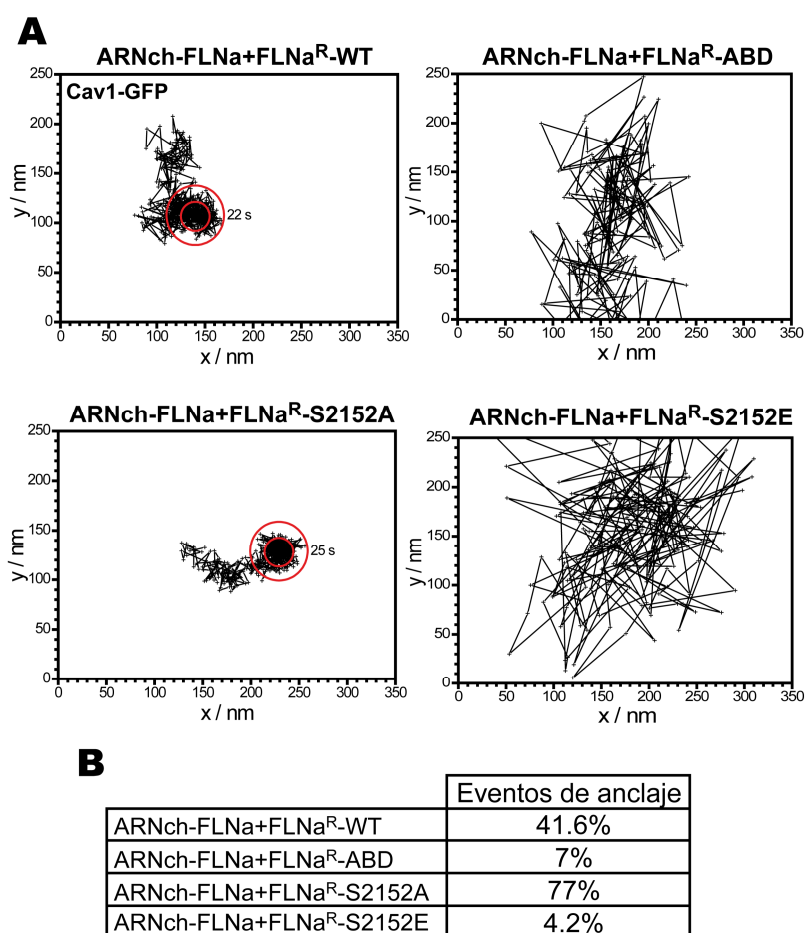
#### 4.4.4. La unión de FLNa a la actina y su fosforilación en Ser2152 son necesarios para la distribución de Cav1 en células en adheridas a la MEC

Dado que el citoesqueleto de actina regula la dinámica de Cav1 se planteó si la regulación que FLNa ejerce sobre la dinámica de Cav1 estaría mediada por la capacidad de la primera de interaccionar con actina. Por otro lado, puesto que se ha descrito que FLNa requiere la fosforilación en su Ser2152 en numerosos procesos (Stossel y col., 2001) se decidió estudiar el efecto de esta fosforilación en la dinámica de Cav1. Para llevar a cabo estos estudios, se construyeron tres mutantes de FLNa a partir de una construcción WT de FLNa resistente al ARNch y fusionada al epítipo fluorescente dsRED (FLNa-ARNch<sup>R</sup>-WT): un mutante de delección para el dominio de unión a actina que carece del fragmento que comprende desde el aminoácido 1 hasta el 275 (FLNa-ARNch<sup>R</sup>-ABD), un mutante no fosforilable (FLNa-ARNch<sup>R</sup>-S2152A) mediante la sustitución de la Ser2152 por una Ala, y un mutante potencialmente fosfomimético (FLNa-ARNch<sup>R</sup>-S2152E) mediante al sustitución de la Ser2152 por un Glu (Figura 39A) (ver Materiales y Métodos). Mediante WB se confirmó la expresión a niveles similares de los tres mutantes y la FLNa-ARNch<sup>R</sup>-WT, confirmando que todas las construcciones conservaron la resistencia al ARNch-FLNa. Igualmente, se comprobó que sólo la FLNa-ARNch<sup>R</sup>-ABD, al ser la única que conservaba la Ser2152, podía fosforilarse en ese residuo (Figura 39B).



**Figura 39: Construcción de mutantes de FLNa.** (A) Dibujos esquemáticos de FLNa WT y de los tres mutantes: mutante no fosforilable (FLNa<sup>R</sup>-S2152A), mutante potencialmente fosfomimético (FLNa<sup>R</sup>-S2152E) y mutante de delección para el dominio de unión a actina (FLNa<sup>R</sup>-ABD); todos ellos fusionados a la proteína fluorescente dsRED. (B) Western blot de extractos de células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa transfectadas con plásmido “señuelo” (mRFP), con FLNa<sup>R</sup>-WT, FLNa<sup>R</sup>-S2152A, FLNa<sup>R</sup>-S2152E o FLNa<sup>R</sup>-ABD. Los WB se incubaron con un anticuerpo contra FLNa y otro contra fosfo-FLNa (pFLNa-Ser2152). La proteína γ-tubulina fue usada como control de carga.

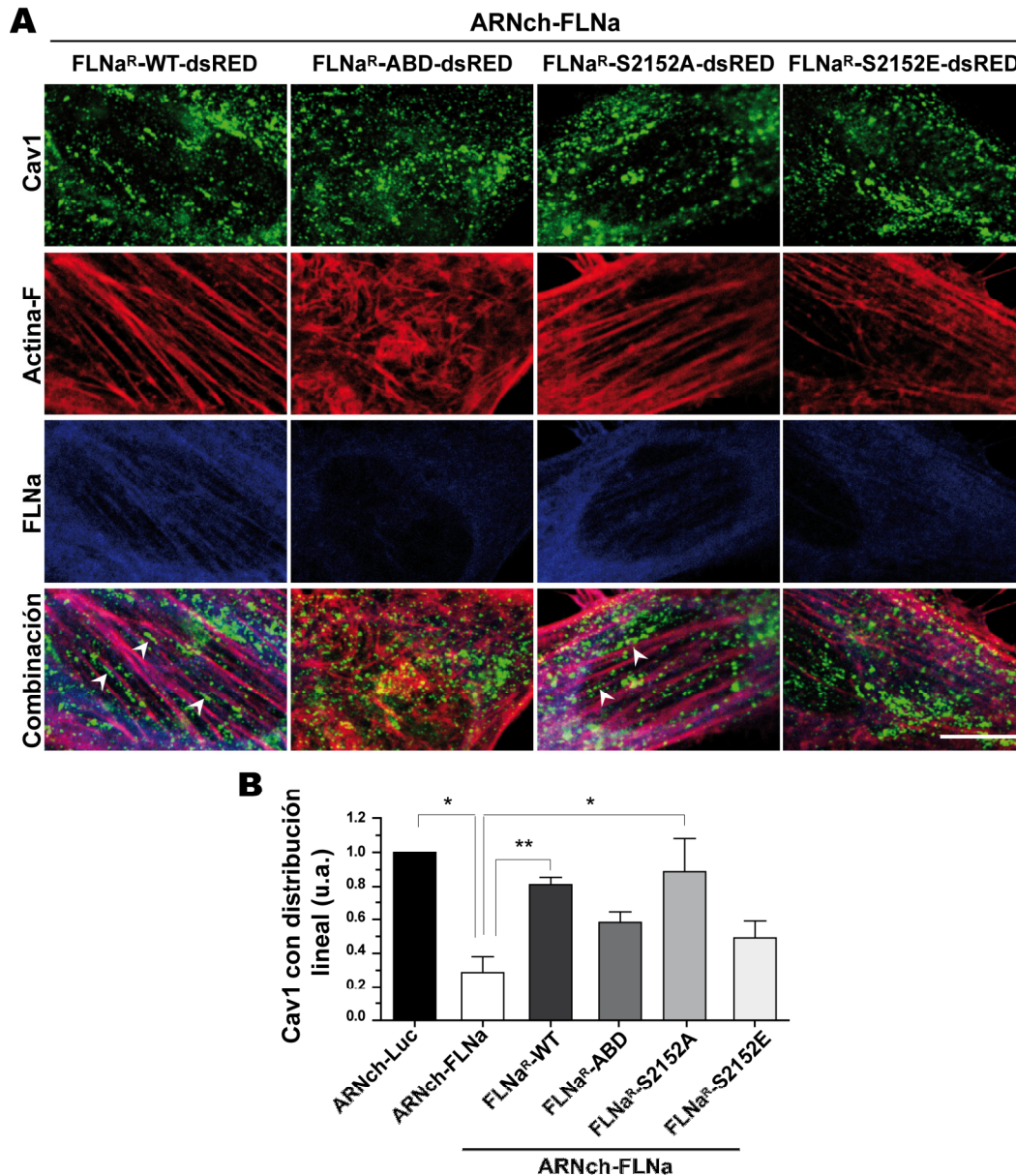
En primer lugar, se analizó el efecto de estas construcciones sobre el anclaje de las vesículas de Cav1-GFP. En este sentido, la sobreexpresión de la FLNa<sup>R</sup>-WT fue capaz de rescatar la supresión del anclaje observado en las células deficientes para FLNa (Figura 40A,B). Cabe destacar que la sobreexpresión de FLNa<sup>R</sup>-S2152A resultó en un aumento de los eventos de anclaje por encima de los niveles basales observados en las células control (Figura 40A,B), sugiriendo que la fosforilación es necesaria para controlar los niveles de anclaje de las vesículas de Cav1. De acuerdo con este resultado, ni el mutante fosfomimético, FLNa<sup>R</sup>-S2152E, ni el mutante sin el dominio de unión a actina, FLNa<sup>R</sup>-ABD fueron capaces de revertir el defecto en anclaje mostrado por las células deficientes en FLNa (Figura 40A,B).



**Figura 40: La capacidad de FLNa de unir actina así como su dinámica de fosforilación regula el anclaje de las vesículas de Cav1. (A)** Trayectorias típicas de vesículas de Cav1-GFP en células ARNch-FLNa expresando FLNa<sup>R</sup>-WT, FLNa<sup>R</sup>-ABD, FLNa<sup>R</sup>-S2152A o FLNa<sup>R</sup>-S2152E. **(B)** Porcentaje de trayectorias mostrando eventos de anclaje para todas las condiciones. Se analizaron 10-30 trayectorias por célula, 5-10 células por experimentos y 3-4 experimentos por condición.

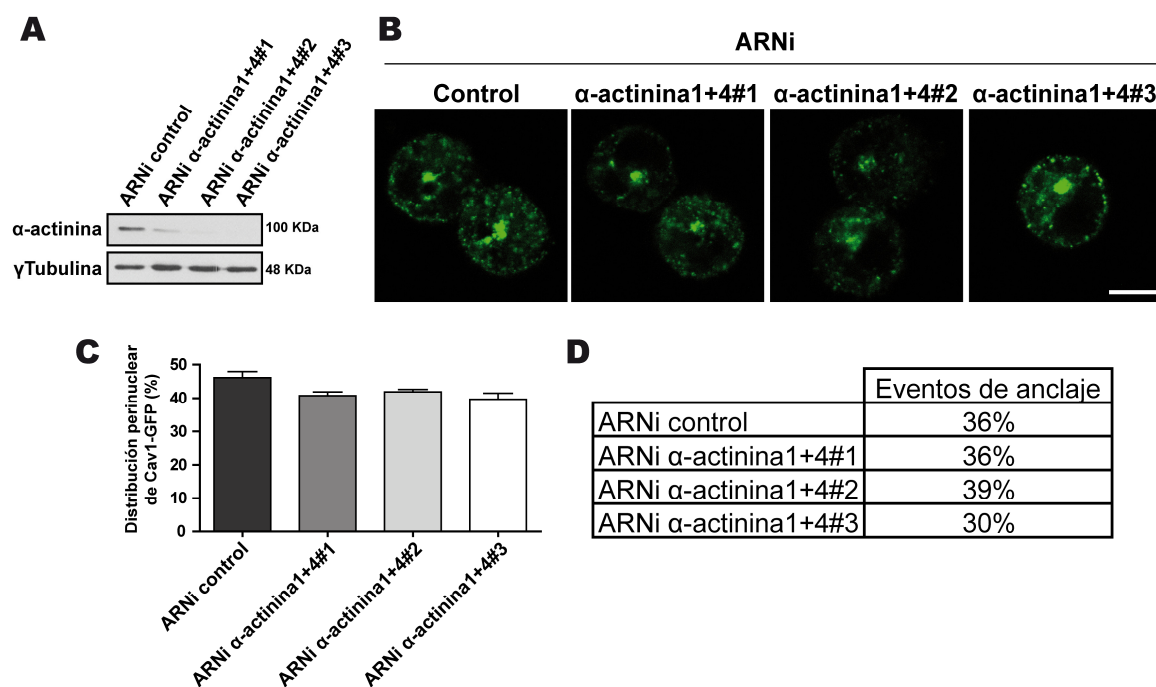


Además, y correlacionando con los resultados de anclaje, el mutante no fosforilable FLNa<sup>R</sup>-S2152A, pudo rescatar el defecto en la distribución lineal de Cav1 producido por el silenciamiento de FLNa en la misma medida que la forma WT de la proteína resistente al ARNch, y contrariamente a lo observado con los mutantes FLNa<sup>R</sup>-S2152E y FLNa-ARNch<sup>R</sup>-ABD (Figura 41A,B). Estos resultados sugieren que FLNa actúa como nexo de unión entre la Cav1 y la actina de forma dependiente de su fosforilación en Ser2152.



**Figura 41: La capacidad de FLNa de unir actina así como su dinámica de fosforilación regula la distribución lineal de las vesículas de Cav1. (A)** La capacidad de FLNa de unir actina y sus niveles de fosforilación en la Ser2152 regulan la distribución lineal de Cav1 endógena coalineada con las fibras de actina. Cuantificación del alineamiento de las vesículas de Cav1 en las células HeLa-ARNch-FLNa expresando FLNa<sup>R</sup>-WT, FLNa<sup>R</sup>-ABD, FLNa<sup>R</sup>-S2152A y FLNa<sup>R</sup>-S2152E. (ver Materiales y Métodos). \* $p=0.0171$  (ARNch-Luc vs ARNch-FLNa), \*\* $p=0.0025$  (ARNch-FLNa vs ARNch-FLNa+FLNa<sup>R</sup>-WT) y \* $p=0.0183$  (ARNch-FLNa vs ARNch-FLNa+FLNa<sup>R</sup>-S2152A) ( $n=4$ ). Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba  $t$  de Student. u.a.: unidades arbitrarias. **(D)** Imágenes representativas de microscopía confocal de células HeLa-ARNch-FLNa expresando FLNa<sup>R</sup>-WT, FLNa<sup>R</sup>-ABD, FLNa<sup>R</sup>-S2152A y FLNa<sup>R</sup>-S2152E. Las células se tiñeron con un anticuerpo contra Cav1 y con faloidina. Las cabezas de flecha señalan un grupo de vesículas de Cav1 alineadas solapando con un filamento de actina y

Los resultados presentados hasta el momento muestran que FLNa regula la dinámica de las caveolas de forma específica mediante algún mecanismo adicional a su acción sobre el citoesqueleto de actina. No obstante, dado que ambas moléculas, FLNa y actina regulan el anclaje de las vesículas de Cav1 y su internalización en suspensión, se plantea la hipótesis de que el efecto de FLNa sobre la regulación de las caveolas esté mediado por la capacidad de FLNa de entrecruzar filamentos de actina (Stossel y col., 2001). Si esto fuese así, la ausencia de otra proteína con la misma función de entrecruzar filamentos de actina debería resultar en defectos similares en la dinámica de Cav1. Para contrastar esta hipótesis se silenció la proteína  $\alpha$ -actinina, en particular las isoformas 1 y 4, no específicas de músculo (Figura 42A). La disminución de estas proteínas no resultó en una alteración de la internalización de Cav1 ni en el anclaje de estas vesículas (Figura 42B-D), lo que sugiere que el efecto de la FLNa en estos procesos es específico y que además está regulado por otras propiedades de FLNa, diferentes de su capacidad de entrecruzar filamentos de actina.



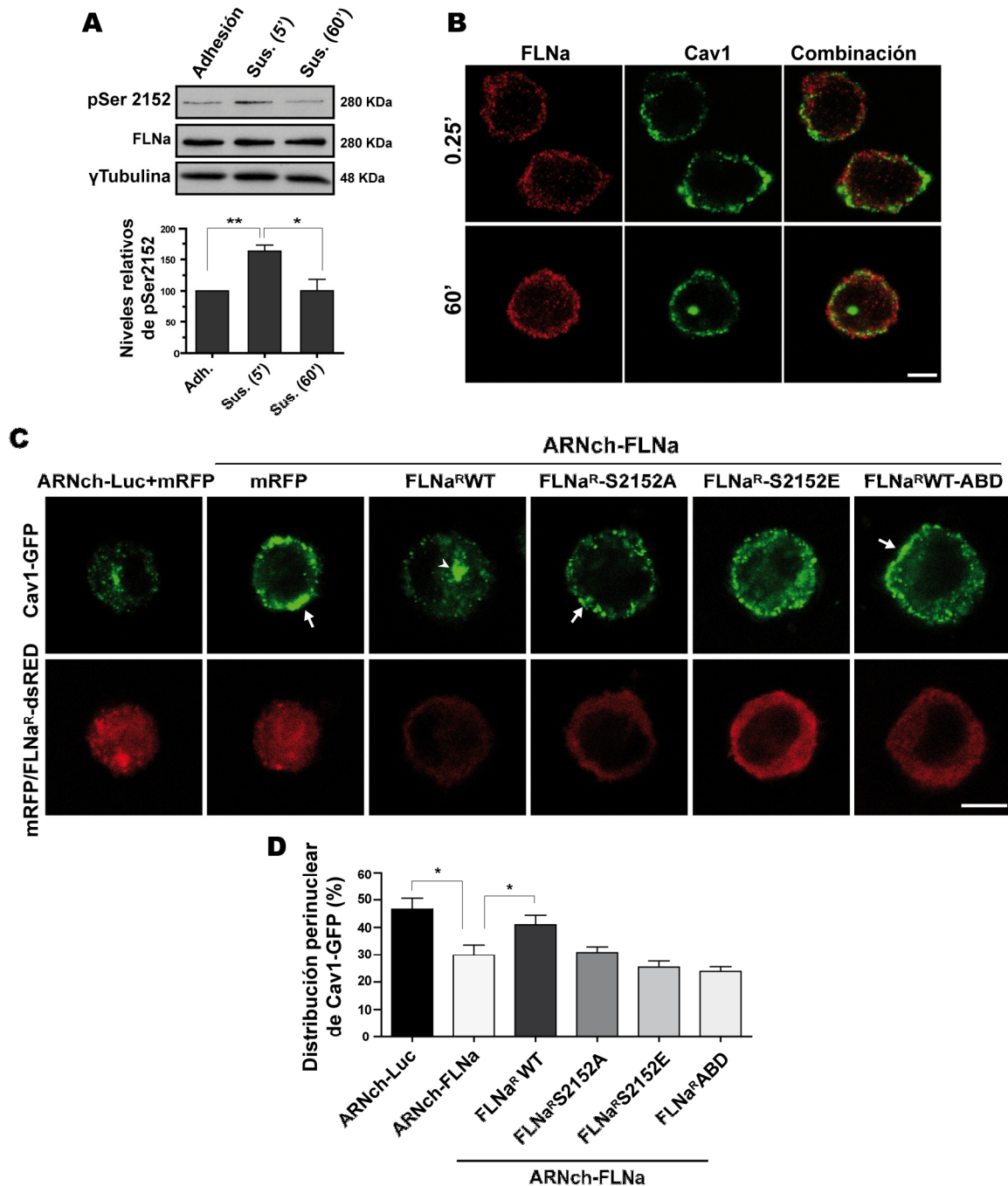
**Figura 42: El efecto de FLNa sobre la dinámica de Cav1 no es general para todas las proteínas que entrecruzan filamentos de actina. (A)** El WB de extractos de células HeLa transfectedas con los ARNi indicados (control o  $\alpha$ -actinina1+4) se incubó con un anticuerpo contra  $\alpha$ -actinina. La proteína  $\gamma$ -tubulina fue usada como control de carga. **(B)**  $\alpha$ -actinina no es necesaria para la internalización de Cav1. Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectoraron con los ARNi de  $\alpha$ -actinina1+4 o control. Transcurridas 48 horas desde la transfección, las células se pusieron en suspensión durante 1 hora y a continuación se fijaron. Barra, 10 $\mu$ m. **(C)** Cuantificación de células con distribución perinuclear de Cav1-GFP tras los distintos tratamientos (n=3). Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student. **(D)** Porcentaje de trayectorias mostrando eventos de anclaje para todas las condiciones. Se analizaron 10-30 trayectorias por célula, 5-10 células por experimentos y 3 experimentos por condición



#### **4.4.5. La unión de FLNa a la actina y su fosforilación en Ser2152 son necesarios para la internalización de Cav1 tras la pérdida de adhesión celular**

Los resultados presentados en los apartados anteriores indican que el anclaje y la distribución lineal de las vesículas de Cav1 dependiente de FLNa requieren la capacidad de ésta de unir actina así como de modificarse postraduccionalmente mediante fosforilación en la Ser2152. Para estudiar el papel que esta fosforilación tiene en la internalización de caveolas durante la pérdida de adhesión al sustrato, se analizó la fosforilación en Ser2152 durante la adhesión y tras su pérdida. Las células adherentes mostraron un nivel basal de fosfo-FLNa (Ser2152), que incrementó a los 5 min. de suspensión (incremento de  $1.629 \pm 0.097$ ) y volvió a los niveles basales tras un tiempo de suspensión prolongado (60 min.) (Figura 43A). Esto sugiere que el incremento de la fosforilación en la Ser2152 puede desempeñar una función en los primeros pasos de la internalización de Cav1.

Para explorar más a fondo esta hipótesis, se analizó la localización de FLNa durante la pérdida de adhesión. Inmediatamente tras la pérdida de adhesión al sustrato ambas proteínas, Cav1 y FLNa, se situaron próximas la una a la otra en la periferia celular, cerca de la membrana plasmática. A tiempos más largos de suspensión, la mayoría de Cav1 se internalizó en el compartimento perinuclear, mientras que la FLNa permaneció en la periferia celular (Figura 43B). Debido a la ausencia de anticuerpos comerciales dirigidos contra fosfo-FLNa (Ser2152) que funcionen en inmunofluorescencia no se pudo analizar su localización celular durante los distintos tiempos de suspensión. Se decidió entonces testar el efecto que los mutantes de fosforilación tenían en la internalización de Cav1 en células HeLa-ARNch-FLNa. Se comprobó que la distribución perinuclear de Cav1-GFP se redujo un 40% en las células ARNch-FLNa respecto a las células ARNch-Luc control (Figura 43C,D). Esta reducción resultó menor que la que ocurre con la transfección transitoria con oligonucleótidos de ARNi (Figura 20C), debido probablemente a mecanismos compensatorios activados durante el establecimiento del silenciamiento permanente. El defecto en la acumulación perinuclear de Cav1 mostrado por las células HeLa-Cav1-GFP-ARNch-FLNa fue rescatado por la introducción de la forma WT de FLNa resistente al ARNch. Sin embargo, ninguno de los mutantes de FLNa del residuo Ser2152 fue capaz de restaurar este defecto. El mutante de FLNa deficiente en unión a actina tampoco fue capaz de restaurar los defectos en la internalización de Cav1-GFP en las células HeLa-ARNch-FLNa (Figura 43C,D).



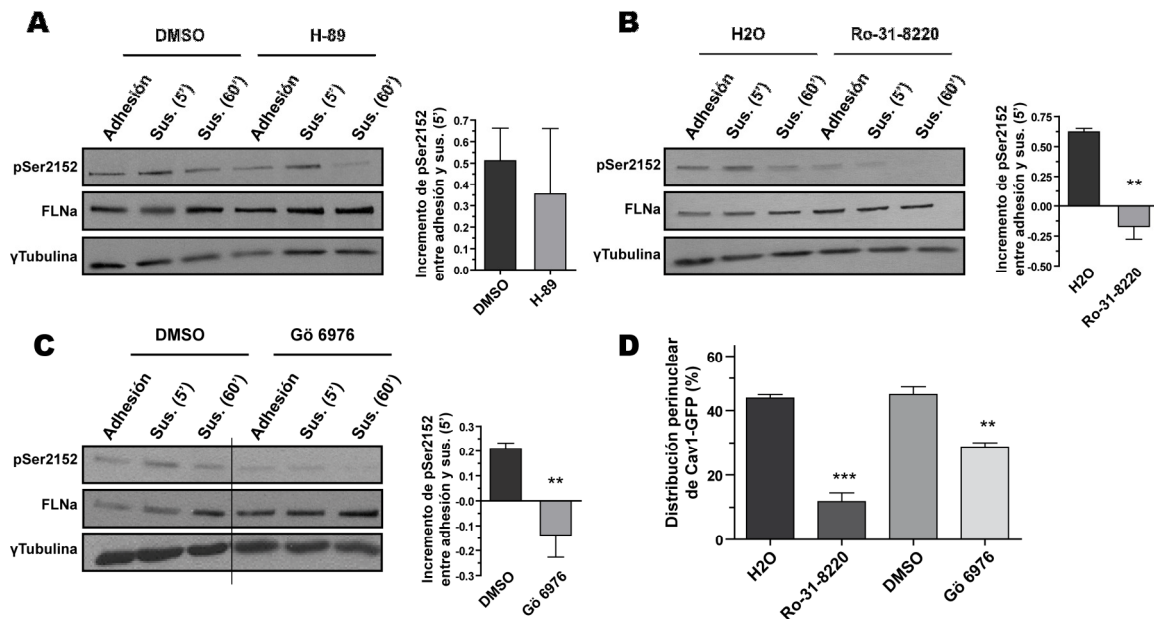
**Figura 43: La fosforilación de FLNa en Ser2152 es necesaria para la internalización de Cav1-GFP.** (A) La pérdida de adhesión celular induce la fosforilación de FLNa en Ser2152. Las células HeLa-Cav1-GFP se mantuvieron en adhesión o en suspensión (Sus.) durante 5 ó 60 min. Los WB de lisados celulares se incubaron con anti-fosfo-FLNa (Ser2152) y anti-FLNa. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga. Los cambios en la fosforilación de Ser2152 se cuantificaron por densitometría usando *Quantity one*.  $**p=0.0074$  (Adhesión y Sus. 5') y  $*p=0.0421$  (Sus. 5' y 60'), (n=4). (B) Las células HeLa-Cav1-GFP se pusieron en suspensión durante 0.25 y 60 min. Seguidamente se realizó inmunofluorescencia de FLNa. Se muestra la localización de Cav1-GFP y FLNa próxima a la MP o la internalización de Cav1-GFP pero la retención de FLNa en la periferia celular tras 0.25 min. y 60 min. de suspensión respectivamente. (C) La fosforilación de FLNa en Ser2152 es necesaria para la internalización de Cav1. Las imágenes, tras 60 min. de suspensión, muestran las Cav1-GFP internalizada en las células HeLa-ARNch-Luc, pero no en las ARNch-FLNa. La introducción de FLNa<sup>R</sup>-WT, pero no de FLNa<sup>R</sup>-S2152A, FLNa<sup>R</sup>-S2152E o FLNa<sup>R</sup>-ABD, restauró la internalización de Cav1-GFP en las células FLNa KD. Las flechas y las cabezas de flecha muestran la distribución de Cav1-GFP en la periferia celular y en el compartimento perinuclear respectivamente. (D) Cuantificación de "C".  $**p=0.087$  (ARNch-Luc y ARNch-FLNa, n=8),  $*p=0.0046$  (ARNch-FLNa y ARNch-FLNa+FLNa<sup>R</sup>-WT, n=5) Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student.

Estos resultados sugieren que tanto la capacidad de la FLNa de interactuar con actina como su fosforilación reversible en Ser2152 son elementos necesarios para la internalización de Cav1 de forma eficiente, y que las quinasas implicadas en esta fosforilación probablemente regulen el tráfico de Cav1.

#### **4.4.6. Identificación de la proteína quinasa responsable de la fosforilación de FLNa en células no adheridas a la MEC**

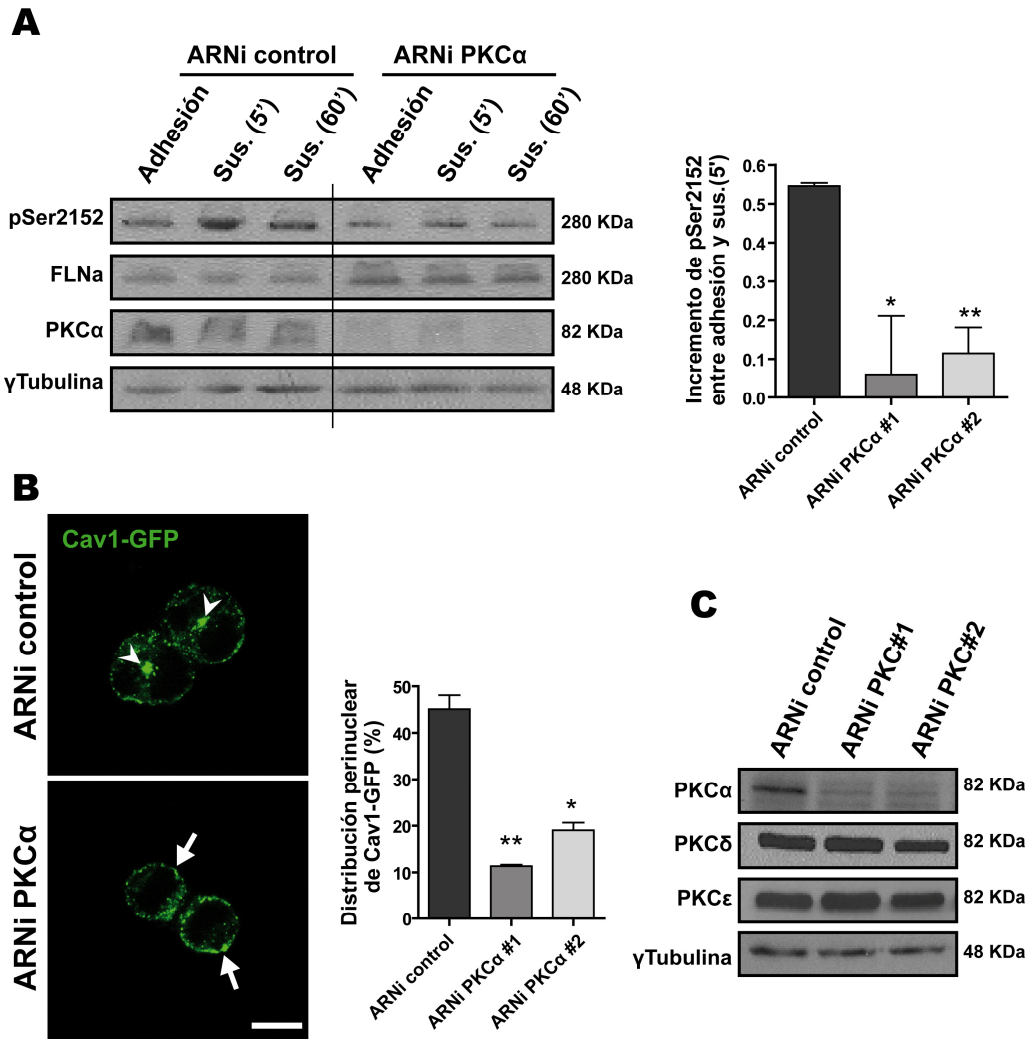
Se han identificado varias quinasas implicadas en la fosforilación de FLNa en la Ser2152 (Stossel y col., 2001). Una de estas quinasas es PKC $\alpha$  (Tigges y col., 2003), que se localiza en caveolas y regula su internalización basal (Smart y col., 1995). Otra quinasa es PKA (Jay y col., 2004), que además es activada por la pérdida de adhesión al sustrato mediante una cinética semejante a la de la internalización de Cav1 (Howe y Juliano, 2000). Por estos motivos, se consideró la potencial implicación de estas quinasas en el proceso de estudio y se analizó el efecto que la inhibición de sus actividades quinasas tenía sobre la fosforilación de FLNa en suspensión. El inhibidor de PKA H-89 no afectó de forma significativa al incremento de la fosforilación de Ser2152 detectada a los 5 min. de suspensión (Figura 44A), descartando su posible implicación.

Por el contrario, el incremento en la fosforilación de Ser2152 se inhibió completamente tras el tratamiento con Ro-31-8220, un inhibidor general de todas las isoformas de PKC (Figura 44B), y por Gö6976, inhibidor de las isoformas convencionales de PKC (Figura 44C), sugiriendo que PKC, pero no PKA, regula la fosforilación de FLNa en suspensión. Seguidamente, para corroborar el requerimiento de esta actividad quinasa en la internalización de Cav1, se analizó el efecto de los inhibidores de PKC en la internalización de Cav1-GFP inducida por pérdida de adhesión al sustrato. En consonancia con los resultados anteriores, los dos inhibidores utilizados en este estudio resultaron en una inhibición de la internalización de Cav1-GFP (Figura 44D), lo que implica la actividad de PKC y la consiguiente fosforilación en Ser2152 en este proceso.



**Figura 44: PKC es necesaria para la fosforilación de FLNa y para la internalización de Cav1-GFP.** (A) Las células HeLa-Cav1-GFP fueron tratadas con un inhibidor de PKA (10  $\mu$ M de H-89 durante 30' en adhesión y durante la suspensión) o con DMSO. Los extractos celulares se analizaron por WB contra fosfo-FLNa (pFLNa-Ser2152) y FLNa. Los niveles de fosforilación de FLNa en Ser2152 se cuantificaron por densitometría (*Quantity one*). El histograma muestra el cambio en pSer2152, calculado como el cociente entre las intensidades de banda en adhesión y tras 5 min. de suspensión. (B) Se repitió el mismo procedimiento que en "A" usando el inhibidor general de PKC (10  $\mu$ M de Ro-31-8220 durante 30' en adhesión y durante la suspensión).  $**p=0.002$  (n=3). (C) Se repitió el mismo procedimiento que en "A" usando el inhibidor específico de las isoformas convencionales de PKC (5  $\mu$ M de Gö 6976 durante 30' en adhesión y durante la suspensión). La línea divisoria refleja dos áreas del mismo gel.  $**p=0.005$  (n=3). (D) Las células HeLa fueron tratadas con 10  $\mu$ M Ro-31-8220, 5  $\mu$ M Gö 6976 o DMSO de la forma indicada y se mantuvieron 60 min en suspensión, se fijaron y se analizó la localización de Cav1-GFP por microscopía de fluorescencia.  $***p=0.0004$  (H<sub>2</sub>O vs Ro-31-8220) y  $**p=0.004$  (DMSO vs Gö 6976) (n=3). Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga.

Para corroborar este resultado y tratar de identificar la isoforma de PKC específicamente implicada en la fosforilación de FLNa en Ser2152, se realizaron los mismos experimentos mostrados anteriormente usando ARNi de PKC en vez de inhibidores químicos. Ya que la isoforma  $\alpha$  de PKC se localiza en caveolas y regula su internalización basal (Tigges y col., 2003) se consideró la candidata más idónea para fosforilar FLNa y regular la internalización de Cav1 en suspensión. Se usaron, por tanto, ARNi específicos dirigidos frente PKC $\alpha$  y se analizó la fosforilación de FLNa y la internalización de Cav1 tras 5 min. y 60 min. de suspensión respectivamente. Se observó que ambos procesos fueron inhibidos por las dos secuencias de ARNi usadas (Figura 45A,B). El análisis de la expresión de PKC confirmó la reducción en los niveles de PKC $\alpha$  pero no de otras isoformas (PKC $\delta$  o PKC $\epsilon$ ) demostrando la especificidad de los ARNi usados para silenciar PKC $\alpha$  (Figura 45C).



**Figura 45: PKC $\alpha$  es necesaria para la fosforilación de FLNa y para la internalización de Cav1-GFP.** (A) Las células HeLa-Cav1-GFP transfectadas con ARNi control o ARNi de PKC $\alpha$  se mantuvieron en adhesión o en suspensión (Sus.) durante 5 o 60 min. WB para detectar los niveles de fosfo-FLNa y FLNa total en los lisados celulares de los distintos tratamientos. También se vio el efecto del ARNi de PKC $\alpha$  sobre su proteína diana. Los niveles de fosforilación de FLNa en Ser2152 se cuantificaron por densitometría (*Quantity one*). El histograma muestra el cambio en pSer2152, calculado como el cociente entre las intensidades de banda en adhesión y tras 5 min. de suspensión. \* $p = 0.03$  (ARNi control vs ARNi PKC $\alpha$ #1) y \*\* $p = 0.003$  (ARNi control vs ARNi PKC $\alpha$ #2, (n=3). (B) Las células HeLa Cav1-GFP transfectadas con ARNi control o ARNi de PKC $\alpha$  se pusieron en suspensión durante 60 min y la localización de Cav1-GFP se monitorizó. Las flechas y las cabezas de flecha muestran la distribución de Cav1-GFP en la periferia o en el interior celular, respectivamente. La internalización de Cav1-GFP se cuantificó como el % de células conteniendo acumulación perinuclear de Cav1-GFP. \*\* $p = 0.0079$  (ARNi control vs ARNi PKC $\alpha$ #1) y \* $p = 0.017$  (ARNi control vs ARNi PKC $\alpha$ #2), (n=2) (C) WB de lisados de células HeLa-Cav1-GFP 48 h tras la transfección con los indicados ARNi. PKC $\delta$  y PKC $\epsilon$  se usaron como control de la especificidad de los ARNi de PKC $\alpha$ . Los datos de los histogramas se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga.

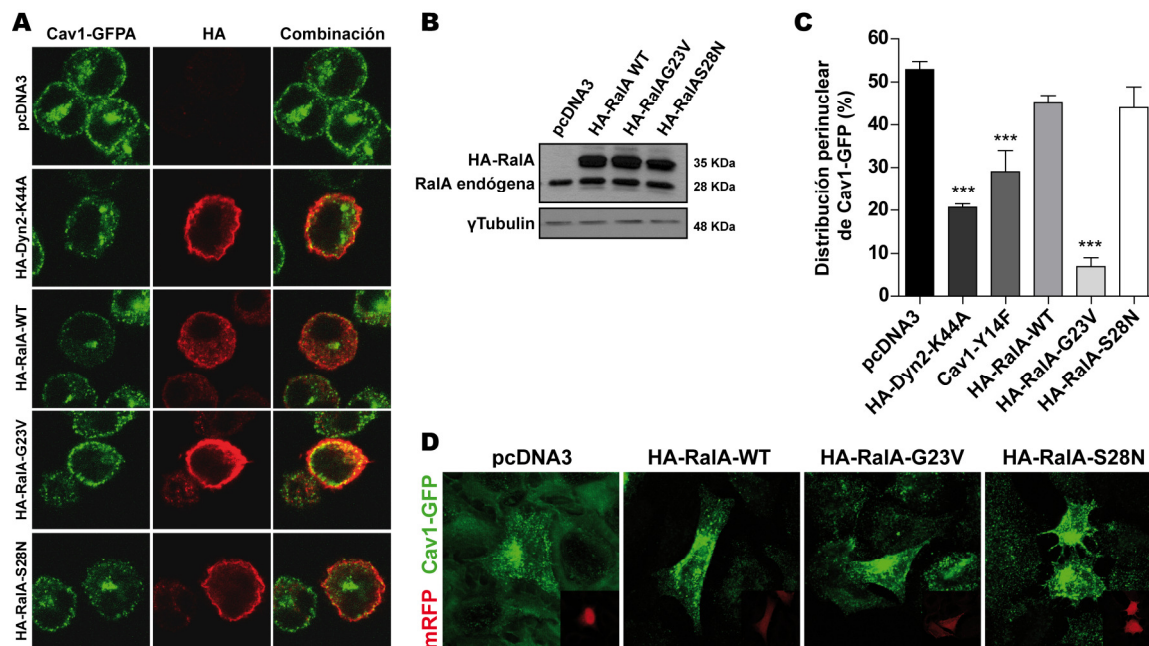
En conjunto, estos resultados indican que PKC $\alpha$  controla la internalización de Cav1 mediante la regulación de la fosforilación de FLNa en Ser2152 inducida por pérdida de adhesión celular.

#### 4.4.7. La GTPasa de unión a FLNa, RalA, regula la internalización de Cav1

Dado que FLNa interacciona con diversas GTPasas de la superfamilia Ras, se decidió estudiar la posible relevancia de estas GTPasas en la regulación de la internalización de Cav1, tras la pérdida de adhesión celular, mediada por FLNa. Se centró el estudio en RalA por ser la única de estas GTPasas cuya unión a FLNa se regula por la carga de GTP (Ohta y col., 1999), de tal forma que con GTP se une a FLNa y con GDP se separa de ésta. Estudios previos han demostrado que RalA se disocia de FLNa tras la pérdida de adhesión celular al sustrato (Klaile y col., 2005). Por tanto, y en base a estas evidencias, se planteó la hipótesis de que la disociación entre RalA y FLNa pueda ser un requisito necesario para la internalización de Cav1.

Para abordar esta hipótesis, se transfectaron las células HeLa-Cav1-GFP con la forma WT de RalA (HA-RalA-WT), con una forma mutante de RalA constitutivamente unida a GTP y, por tanto activa (HA-RalA-G23A), o bien con una forma mutante de RalA unida a GDP de forma constitutiva que se comporta como un dominante negativo (HA-RalA-S28N). Todas estas construcciones se sobreexpresaron en niveles similares, detectados por WB contra la proteína RalA (Figura 46B). En el ensayo de internalización se observó que ni la forma silvestre, HA-RalA-WT, ni el dominante negativo HA-RalA-S28N afectaron la internalización de Cav1-GFP, mientras que la forma constitutivamente activa HA-RalA-G23V bloqueó completamente la internalización de Cav1-GFP (Figuras 46A,C). Además, en estos experimentos se usó como control positivo de bloqueo de la internalización el dominante negativo de Dyn2 (Dyn2-K44A) previamente mostrado. Asimismo, en base a evidencias previas sobre el papel regulador de la fosforilación en la Tyr14 de Cav1 para la internalización de caveolas (del Pozo y col., 2005) se comprobó que una forma mutada de Cav1 no fosforilable en Tyr14 (Cav1-Y14F) podía actuar como dominante negativo, disminuyendo la internalización de caveolas (Figura 46C). Ya que RalA interacciona con el complejo del exocisto para integrar la vía secretoria, (Sugihara y col., 2002) se analizó el efecto que las construcciones de RalA tenían sobre la distribución de Cav1 en adhesión, con el fin de analizar si el efecto observado con RalA-G23V se debía a una estimulación de la exocitosis. Dado que no se observaron diferencias en la distribución de Cav1-GFP con ninguna de las construcciones de RalA (Figura 46D), se concluyó que el efecto de RalA-G23V se ejerce sobre la internalización en suspensión. Este resultado refuerza la hipótesis de que RalA se desplaza hacia su forma unida a GDP con la subsiguiente disociación de FLNa para permitir la internalización de Cav1.

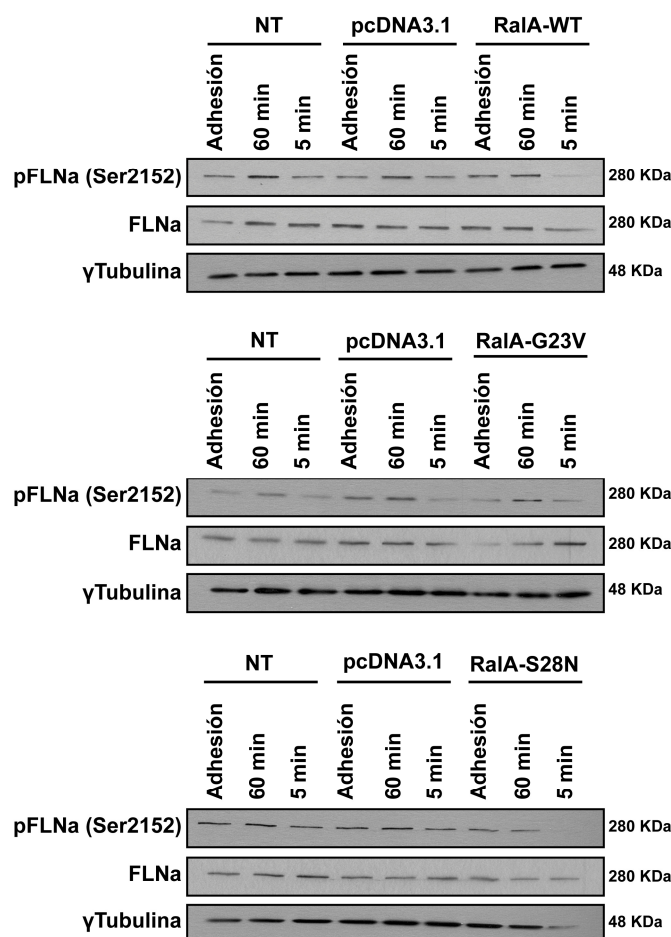




**Figura 46: RalA regula la internalización de Cav1 en suspensión sin alterar su distribución en adhesión.** (A) Las células HeLa-Cav1-GFP se transfectaron con un plásmido control, con el mutante de Dyn2 que actúa como dominante negativo (Dyn2-K44A), con la forma WT de RalA (RalA-WT), con el mutante de RalA constitutivamente activo (RalA-G23V) y con el mutante que actúa como dominante negativo (RalA-S28N) y se pusieron 1h en suspensión tras 48 h de la transfección. (B) WB mostrando la sobreexpresión de las construcciones. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga. (C) Cuantificación de células mostrando localización perinuclear de Cav1-GFP en experimentos como el mostrado en "A". Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. \*\*\* $p < 0.0001$  (pcDNA3.1 vs Dyn2-K44A;  $n=3$ ), \*\*\* $p = 0.0003$  (pcDNA3.1 vs Cav1-Y14F;  $n=5$ ),  $p = 0.0528$  (pcDNA3.1 vs RalA-WT;  $n=3$ ), \*\*\* $p < 0.0001$  (pcDNA3.1 vs RalA-G23V;  $n=3$ ) y  $P = 0.0624$  (pcDNA3.1 vs RalAS28N;  $n=3$ ) Prueba *t* de Student. (D) Las células HeLa-Cav1-GFP se cotransfectaron con plásmido control, con RalA-WT, RalA-G23V o RalA-S28N, y simultáneamente con mRFP en proporción 10/1. Las células se fijaron a las 48 h de la transfección y se analizó la distribución de Cav1-GFP al microscopio de fluorescencia.

#### 4.4.7.1. Papel de RalA G23V en la fosforilación de FLNa en suspensión

Como se comentó anteriormente, tras la pérdida de adhesión celular RalA se disocia de FLNa (Klaile y col., 2005). Además en esta Tesis se muestra que, tanto la fosforilación de FLNa en suspensión como la disociación entre FLNa y RalA (mostrado de forma indirecta con la forma de RalA constitutivamente unida a GTP) impiden la internalización de Cav1-GFP en suspensión. Estos datos, en conjunto, sugieren la hipótesis de que la unión de RalA a FLNa podría impedir la fosforilación de FLNa en Ser2152 porque su sitio de unión solapa bien con el sitio de fosforilación, bien con el sitio de unión de la proteína quinasa, PKC $\alpha$ . Para contrastar esta hipótesis, analizamos la fosforilación de FLNa (Ser2152) en suspensión en células expresando las distintas construcciones de RalA (RalA-WT, RalA-G23V y RalA-S28N). Esta hipótesis tuvo que ser descartada debido a que no se observaron diferencias en la fosforilación (Figura 47).



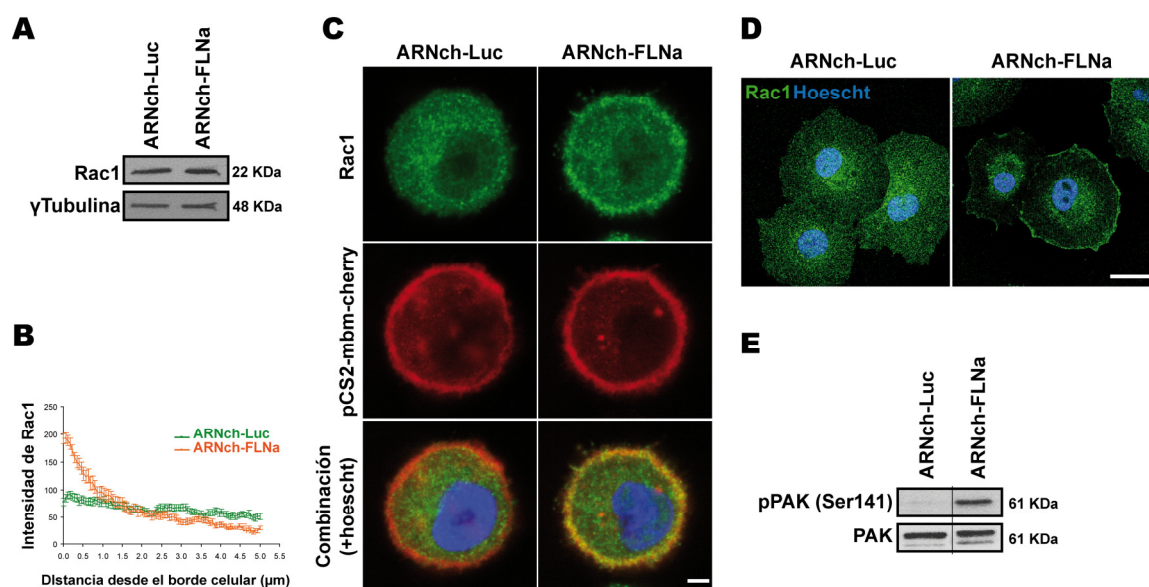
**Figura 47: RalA no afecta a la fosforilación de FLNa en Ser2152 en suspensión.** El incremento en la fosforilación de FLNa en Ser2152 tras 5 min. de suspensión no se vió afectado por la expresión de RalA-WT, RalA-G23V (forma constitutivamente activa) o RalA-S28N (dominante negativo). Las células HeLa-Cav1-GFP sin transfectar, transfectadas con vector vacío o con las distintas construcciones de RalA se mantuvieron en adhesión o en suspensión durante 5 ó 60 min. y los niveles de fosfo-FLNa (pFLNa-Ser2152) y FLNa total en los extractos celulares de los distintos tratamientos se analizaron por WB. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga. NT: no transfectada.

#### 4.4.8. La retención de Cav1 en la MP mediada por FLNa regula el reclutamiento de Rac a la MP y la proliferación celular

Para determinar si el defecto en el tráfico de Cav1 en las células silenciadas para Cav1 correlacionaba con alteraciones en la señalización regulada por Cav1, se midió la localización de Rac1, dado que la internalización de Cav1 provoca la entrada de los sitios de unión a Rac1 (del Pozo y col., 2005). Aunque los niveles de expresión de Rac1 no se vieron afectados por el silenciamiento de la FLNa (Figura 48A), se observaron diferencias significativas en la distribución de Rac1 entre las HeLa-ARNch-FLNa y las células control HeLa-ARNch-Luc tras 1 hora de suspensión, de forma que en las primeras Rac1 permaneció retenido en la periferia celular, a



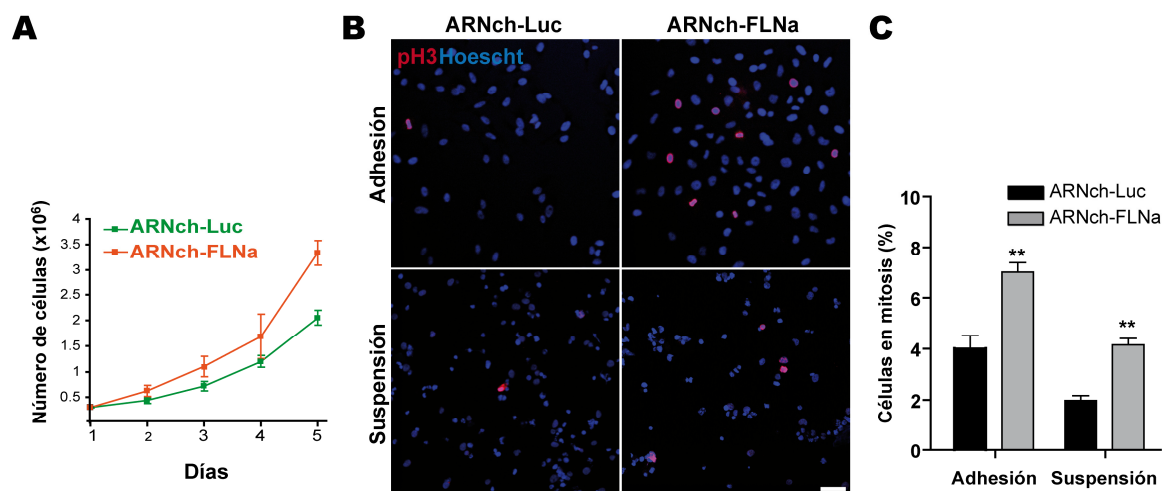
diferencia de la distribución citosólica observada en las células control (Figura 48B,C). De acuerdo con estos resultados, la localización de Rac1 en la MP también se incrementó en ausencia de FLNa durante los procesos de extensión de la célula sobre el sustrato (*spreading*) (Figura 48D). Además, la retención de Rac1 en la MP observado en las células HeLa-ARNch-FLNa en suspensión se vio acompañada por la inducción de la fosforilación de su efector PAK en su residuo Ser142, que se ha descrito como un evento necesario para su activación y la transducción de la señalización de Rac1 (Parrini y col., 2009).



**Figura 48: FLNa regula la localización y señalización de Rac1.** (A) Western blot para confirmar los niveles similares de expresión de Rac1 en células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó como control de carga. (B) La intensidad de Rac1 en la MP se estimó como la intensidad de tinción de Rac1 en líneas de 5  $\mu$ m desde la periferia hasta el interior celular. (C) FLNa es necesaria para la translocación de Rac1 desde la MP al citosol. Las células HeLa con o sin FLNa se mantuvieron en suspensión durante 60 min. A continuación se fijaron, permeabilizaron y se realizó la inmunofluorescencia de Rac1. Barra, 5  $\mu$ m. (D) Las células tratadas como en “C” se volvieron a sembrar sobre FN y se fijaron a los 20 minutos para analizar la localización de Rac1 durante la extensión de la célula sobre el sustrato (*spreading*). Barra, 25  $\mu$ m. (E) PAK continúa fosforilado en la Ser141 en células HeLa-ARNch-FLNa tras 60 min de suspensión. Los extractos celulares se incubaron con anticuerpo contra fosfoPAK (pPAK-Ser141) y contra PAK1. La línea divisoria refleja dos áreas del mismo gel. La proteína  $\gamma$ -tubulina se usó

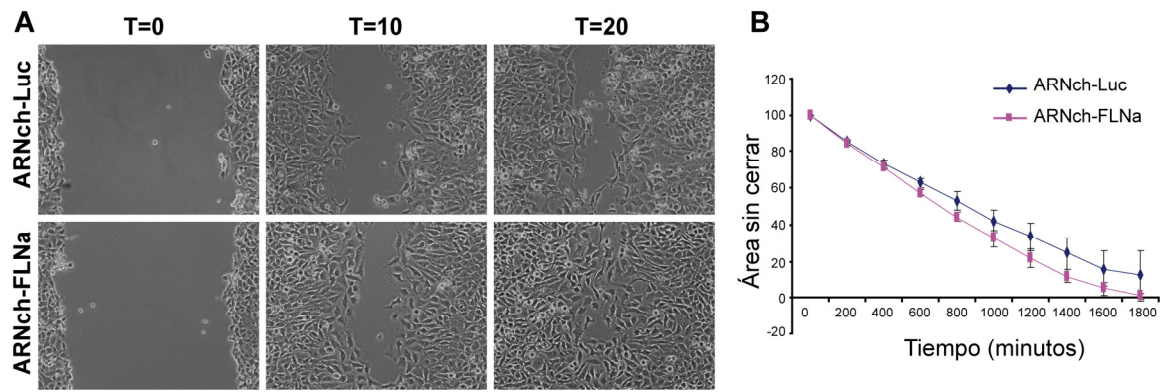
Trabajos previos han demostrado que la señalización de Rac1 es responsable del incremento en la proliferación celular y el crecimiento independiente de anclaje en ausencia de internalización de caveolas (Cerezo y col., 2009). Por tanto, dado que en ausencia de FLNa la señalización por Rac1 continúa estando activa, se decidió estudiar si esta activación tenía algún efecto secundario en la proliferación celular. De acuerdo con estas premisas la tasa de proliferación se incrementó en células HeLa-ARNch-FLNa en adhesión (Figura 49A) en comparación con las células control. Asimismo, se observó un incremento en el número de células mitóticas, detectadas mediante inmunofluorescencia de fosfo-histona-3 (pH3) (Figura 49B,C). Además, las células HeLa-ARNch-FLNa también presentaron una mayor tasa de

mitosis en condiciones de pérdida de adhesión celular (Figura 49B,C), de acuerdo con las evidencias que relacionan Rac1 con el crecimiento y proliferación celular independiente de adhesión. Por tanto, el efecto de FLNa en la internalización de caveolas tiene consecuencias en la localización de moléculas señalizadoras como Rac1 que, a su vez, regulan la proliferación dependiente e independiente de anclaje.



**Figura 49: FLNa regula la proliferación celular.** (A) Las células cultivadas en medio con 2% de suero se levantaron con tripsina y se contaron con un contador de células (CASY® Model TT; Roche Applied Science). Se muestran los valores medios obtenidos a los 2-5 días en triplicado a cada tiempo de observación. (B) Las células HeLa-ARNchLuc y ARNch-FLNa se mantuvieron en adhesión o en suspensión durante 20 horas. Seguidamente se fijaron y se incubaron con anticuerpo contra fosfohistona3 (pH3) y con Hoechst. Barra, 50  $\mu$ m. (C) Se muestra el porcentaje de células con tinción de pH3. Los datos se corresponden con las medias  $\pm$  s.e.m. Prueba *t* de Student. (n=3).

La señalización de Rac1 también regula la migración celular (Grande-Garcia y col., 2007). Además, se ha descrito recientemente que la FLNa es necesaria para limitar la capacidad de migración e invasión de células tumorales (Xu y col., 2010). Por tanto, se decidió estudiar, mediante ensayos de cierre de herida *in vitro*, si la migración celular también estaba alterada en las células Hela-ARNch-FLNa respecto a las células control. Si bien los datos no permitieron aseverar una diferencia estadísticamente significativa, se observó una tendencia de aumento de proliferación en ausencia de FLNa (Figura 50), en consonancia con el estudio anteriormente mencionado. Es necesario, no obstante, tener en cuenta que este resultado puede tener una componente debida a la mayor proliferación celular en ausencia de FLNa, por lo que sería necesario repetir este experimento introduciendo un inhibidor de la proliferación celular.



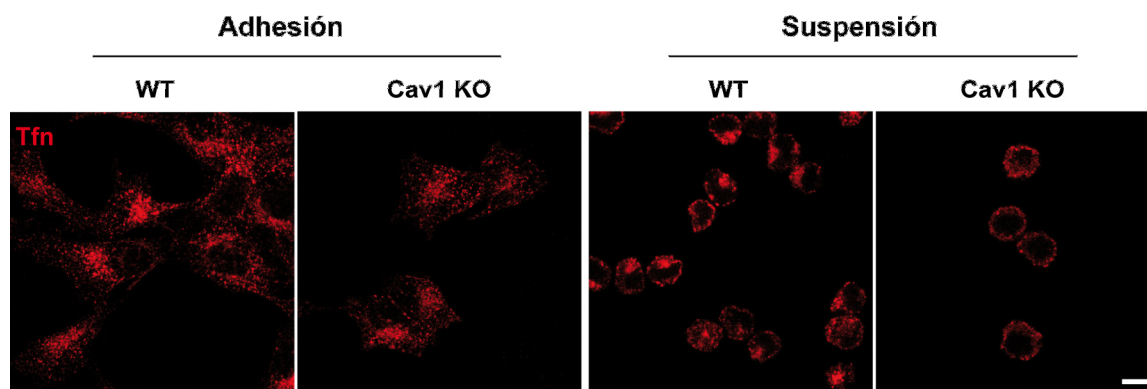
**Figura 50: La usencia de FLNa acelera la migración celular.** (A) Las células HeLa-ARNch-Luc y HeLa-ARNch-FLNa fueron cultivadas hasta formar una monocapa y se realizaron incisiones en ellas con una punta de pipeta de 1 mm de grosor. El cierre de herida fue monitorizado por video-microscopía. Las imágenes muestran una herida representativa en ambos tipos celulares a tiempo 0, 10 y 20 horas tras la incisión. (B) Representación gráfica del área de la herida sin cerrar en ambos tipos celulares.

#### **4.5. Regulación de la internalización de transferrina por Cav1 y FLNa en suspensión**

El papel que las caveolas desempeñan en la transducción de señales en respuesta a situaciones de estrés mecánico está cobrando cada vez más importancia. Aparte de otros trabajos que describen el papel de las caveolas en la mecanotransducción (Boyd y col., 2003; Rizzo y col., 1998), se ha establecido recientemente una nueva función para las caveolas como mecanorreceptoras de cambios de tensión de la membrana inducidos por estímulos de estrés mecánico, lo que sugiere que las caveolas podrían actuar como un reservorio fisiológico de membrana que minimizaría las variaciones en la tensión de membrana (Sinha y col., 2011). El funcionamiento de este mecanismo estaría regulado por los cambios de conformación caveolar, que pasaría de presentar su forma típica de  $\Omega$  a una forma aplanada, proporcionando así más superficie de membrana.

En esta Tesis se sugiere que un tipo de regulación semejante podría ocurrir cuando la célula es colocada en suspensión, tras perder el anclaje al sustrato proporcionado por la MEC. En este caso, la célula estaría expuesta a una pérdida de tensión, en lugar de a un aumento, como consecuencia de la disminución de la relación entre superficie y volumen (Colbert y col., 2009). De esta forma, puede elaborarse la hipótesis de que, en suspensión, las caveolas detectarían la pérdida de tensión y la célula respondería ante esta señal internalizando parte de la membrana para restablecer dicha tensión. Sin embargo, en las condiciones en que no hay caveolas o éstas presentan defectos en su internalización, el problema de tensión no podría resolverse, por lo que las células deberían buscar otras estrategias para restablecer la relación entre superficie y volumen, como sería aumentar el tamaño celular.

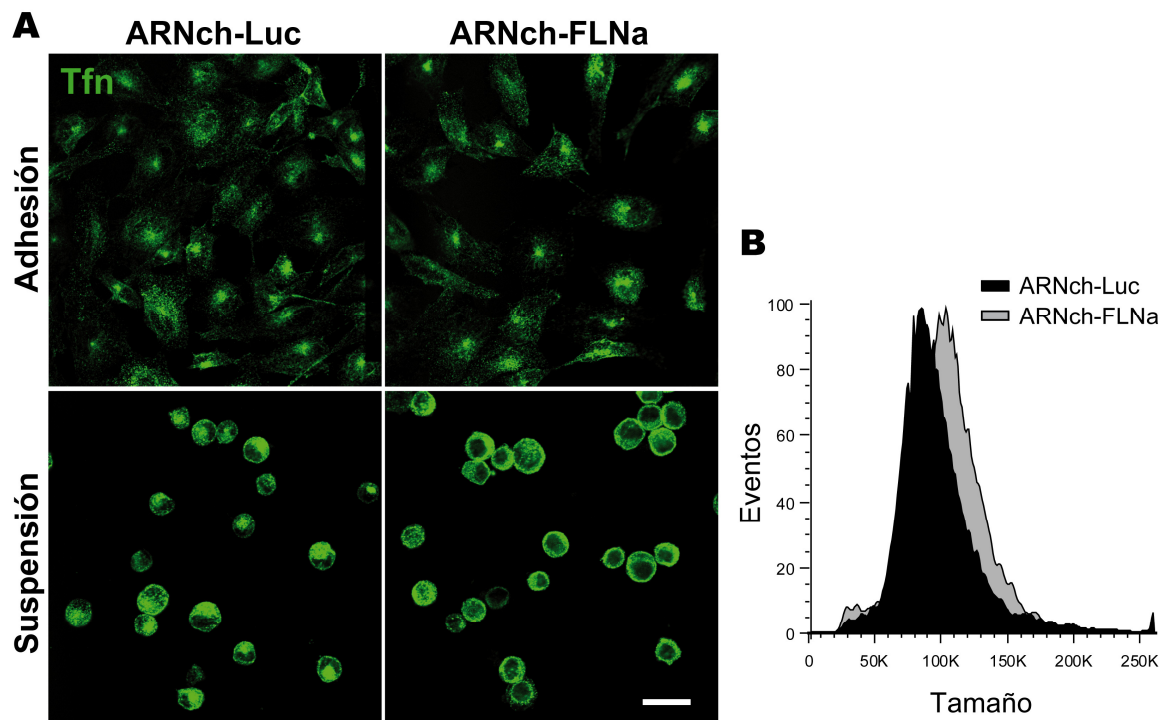
Para contrastar esta hipótesis, se hicieron ensayos de internalización de membrana en suspensión usando como marcador una molécula en cuyo tráfico no se hayan implicado a las caveolas. Se decidió usar la transferrina (Tfn), una molécula que penetra en las células adherentes tras la unión a su receptor mediante una endocitosis dependiente de clatrina (Kumari y col., 2010). Se utilizaron fibroblastos de ratón WT o Cav1 KO que fueron incubados con Tfn tanto en adhesión como en suspensión. Se observó que en células adherentes la Tfn se endocitó por igual en las células con y sin Cav1, mientras que tras la pérdida de adhesión al sustrato la endocitosis de Tfn ocurrió únicamente en presencia de Cav1 (Figura 51).



**Figura 51: Cav1 regula la endocitosis de Tfn en suspensión pero no en adhesión.** Cav1 no es necesaria para la endocitosis de Tfn-TxRed en adhesión. Los fibroblastos de ratón WT o Cav1 KO se incubaron con Tfn durante 15 min. en adhesión o en suspensión. Seguidamente se fijaron y la localización de Tfn-TxRed se analizó por microscopía de fluorescencia. La Tfn se incorporó al interior de las células WT o KO en adhesión pero sólo en las WT en suspensión. Barra, 10  $\mu$ m.

Dado que los resultados presentados en esta Tesis muestran una implicación de FLNa en la regulación de la dinámica de caveolas, se decidió validar el resultado previo con células deficientes en FLNa. Para ello, se repitieron los experimentos de endocitosis de Tfn en las células HeLa-ARNch-Luc y ARN-ch-FLNa, tanto en adhesión como en suspensión. Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores, con una endocitosis de Tfn similar en adhesión independientemente de la presencia de FLNa pero con una endocitosis de Tfn en suspensión exclusiva en presencia de FLNa (Figura 52A). Otro parámetro que puede interpretarse como estimador de la ausencia de internalización de membrana plasmática es un aumento en el tamaño celular, como consecuencia del bloqueo de la endocitosis de caveolas y en relación a los cambios de tensión celular. En este sentido, se observó un aumento del tamaño celular tras una hora de suspensión de las células ARN-ch-FLNa respecto a las HeLa-ARNch-Luc (Figura 52B).

Aunque estos resultados deben ser contrastados con otros abordajes, permiten postular la hipótesis de que la internalización de la caveolas en condiciones de suspensión constituye un mecanismo de control de la tensión de membrana y, por consiguiente, del tamaño celular, al mismo tiempo que proponen una implicación de las proteínas Cav1 y FLNa en dichos fenómenos.



**Figura 52: FLNa regula la endocitosis de Tfn en suspensión pero no en adhesión. (A)** FLNa no es necesaria para la endocitosis de Tfn en adhesión. Las células HeLa-ARNch-Luc o ARNch-FLNa se incubaron con Tfn-488 durante 15 min. en adhesión o en suspensión. Seguidamente se fijaron y la localización de Tfn se analizó por microscopía de fluorescencia. La Tfn se incorporó al interior de las células con o sin FLNa en adhesión pero sólo en presencia de FLNa en suspensión. Barra, 25  $\mu$ m. **(B)** Tamaño celular medido por FACS en las células HeLa-ARNch-Luc y ARNch-FLNa tras 60 min. de suspensión.

## **5. DISCUSIÓN**



En esta Tesis Doctoral se ha analizado el proceso de internalización de caveolas tras la pérdida de adhesión celular, con la finalidad de identificar y caracterizar el compartimento intracelular donde se acumula la Cav1 internalizada en suspensión, así como las proteínas implicadas en su regulación y su mecanismo de acción. Para ello se han llevado a cabo diversos abordajes de pérdida y/o ganancia de función, así como el uso de compuestos químicos que regulan una serie de proteínas candidatas, utilizando un ensayo de internalización previamente establecido (del Pozo y col., 2004). Con este abordaje, se han identificado varias proteínas que actúan como activadores o represores del proceso, y el estudio se ha centrado principalmente en la regulación por una ruta compuesta por FLNa y PKC $\alpha$ .

Los resultados aquí presentados muestran que el compartimento donde la Cav1 es internalizada en suspensión colocaliza con Rab11, un marcador del endosoma de reciclaje (Sonnichsen y col., 2000). Esto es consistente con el reciclaje de Cav1 a la membrana plasmática tras el replaqueo de las células sobre FN, lo que indica que el destino final de la ruta de internalización de Cav1 en suspensión no es su degradación. La subunidad B de la toxina colérica, un ligando del gangliósido GM1, también se acumula en un compartimento de reciclaje tras la pérdida de adhesión celular (Balasubramanian y col., 2007) y es reciclada a la MP tras en replaqueo en FN (Balasubramanian y col., 2009; Balasubramanian y col., 2007; del Pozo y col., 2005). Sin embargo, hay diferencias importantes entre el tráfico de Cav1 y GM1. En condiciones de reposo, GM1 se acumula en dominios de membrana ricos en colesterol con composición lipídica similar a la de las caveolas (Parton, 1994), aunque sólo alrededor del 20% del GM1 de la membrana está contenido en las caveolas (del Pozo y col., 2005). Cuando ocurre la internalización de caveolas tras la pérdida de adhesión celular, GM1 es relocalizado a las caveolas, aumentando significativamente su colocalización con Cav1 a tiempos cortos tras la recuperación de la adhesión (2-10 min). Sin embargo, en periodos más largos de suspensión, esta colocalización retorna a los niveles basales (del Pozo y col., 2005), sugiriendo que estas moléculas se acumulan en compartimentos de reciclaje diferentes y que por tanto, su reciclaje a la membrana plasmática esté mediado probablemente por rutas distintas. De hecho, el reciclaje de GM1 es dependiente de Arf6 y RalA, pero independiente de Cav1 (Balasubramanian y col., 2009; Balasubramanian y col., 2007). Nuestros resultados sugieren que RalA no sólo no está implicada en el tráfico hacia la membrana de Cav1, sino que, por el contrario, regula su endocitosis. Por tanto, GM1 utiliza las vesículas de Cav1 para internalizarse, pero posteriormente se disocia de ellas de forma que ambas moléculas viajan mediante rutas distintas. Esto explica el hecho de que, mientras RalA desempeña un papel en el reciclaje de GM1 (Balasubramanian y col., 2009), simultáneamente pueda desempeñar una función importante durante la internalización de Cav1.



Por otra parte, en este estudio se han determinado varios reguladores de la internalización de Cav1 mediante un abordaje de pérdida de función. De las veinticuatro proteínas probadas se identificaron once reguladores positivos, cuyo silenciamiento se tradujo en una disminución de la internalización de Cav1, dos cuyo silenciamiento no produjo ningún efecto, dos cuyo silenciamiento resultó en una activación del proceso, y nueve cuyo fenotipo no pudo concluirse debido a dificultades técnicas para probar su eficiencia de silenciamiento o a resultados contradictorios entre distintas secuencias (Tabla V).

**Tabla V.** Se detallan las proteínas testadas, número de secuencias, eficiencia de silenciamiento y fenotipo obtenido tras el ensayo de internalización de Cav1-GFP.

Proteína	Nº de secuencias testadas	Eficiencia silenciamiento	Fenotipo bloqueando la internalización
Abi1+2	4 juntas	Buena	No
$\alpha$ -Actinina-1+4	3	Buena	No
		Buena	No
		Buena	No
Arp3	4 juntas	¿?	No
c-Abl/Arg	2	Buena	Sí
		Buena	Sí
CTTN	1	Buena	No
CrkII	2	Buena	Sí
		Buena	No
Csk	1	Mala	Sí
mDia1	1	Buena	Sí
mDia2	1	¿?	No
Dyn2	1	Buena	Sí
FBP17	1	Buena	Sí
FLNa	4	Buena	Sí
		Buena	Sí
		Buena	Sí
		Buena	Sí
FLNb	2	Buena	Sí
		Buena	Si
Formina-1	2 juntas	¿?	No
Grb10	2	Buena	Sí
		Buena	Sí
Integrina- $\beta$ 3	2	Mala	Sí
		Buena	No
P21Arc	1	Buena	No
Pak1	1	Buena	Sí
PKC $\alpha$	3	Buena	Sí
		Buena	Sí
		Buena	Sí
RhoA	3	Buena	Sí
		Buena	Sí
		Buena	Sí
SDPR	1	¿?	Sí
Src	2	Mala	Sí
		Mala	Sí
Talina-1	2	Buena	Sí
		Buena	Sí
N-WASP	2	Buena	Sí
		Buena	Sí
		Buena	No

La alta proporción de candidatos testados que resultaron estar potencialmente implicados en la internalización de Cav1 puede deberse a dos motivos principales:

- La selección de proteínas a testar se hizo en base a evidencias previas publicadas en la literatura científica, lo que incrementaba la probabilidad de su participación en la vía de estudio.
- El proceso de internalización de Cav1 en células HeLa-Cav1-GFP resultó muy sensible a la toxicidad, por lo que parte de las proteínas identificadas como positivas podrían corresponderse con falsos positivos. Los falsos positivos, también pueden deberse a los efectos *off-target* de los ARNi.

Por tanto, este estudio no permite concluir que estas proteínas estén realmente regulando la internalización de Cav1, sino que ofrece un punto de partida desde el que estudiar los positivos en mayor profundidad, incluyendo mayor número de oligonucleótidos para aquellas proteínas en las que sólo se probó un ARNi (FBP17, PAK, Csk, CTTN, mDia2 y SDPR). No así para Dyn2, cuyo papel regulador de este proceso estaba previamente establecido (del Pozo y col., 2005) y fue usado, en el presente estudio, como control positivo. Además, debería corroborarse la potencial implicación rescatando la alteración observada tras la transfección del ARNi, introduciendo un ADNc de la proteína diana, insensible al ARNi. Asimismo, el uso de compuestos químicos que alteren la función de la proteína o el uso de otras líneas celulares, preferiblemente KO para la proteína, y el seguimiento de la Cav1 endógena, son aproximaciones adicionales que deberían ser usadas para ampliar el estudio de estos candidatos. Alternativamente a la confirmación del papel de estas proteínas, sería interesante identificar más reguladores utilizando tecnologías de rastreo masivo de alto rendimiento. En este sentido, ya se han comenzado en el laboratorio, y en colaboración con la Unidad de Celómica del CNIC, los ensayos preliminares para la realización de este abordaje.

El hecho de que un buen número de los reguladores de la internalización de Cav1 identificados son también reguladores de actina, como son la ruta c-Abl/Arg-mDia1, promotora de la internalización, y los complejos Arp2/3 y WAVE/Abi1+2, inhibidores de la internalización, pone de manifiesto la importancia del eje actina-Cav1 en la regulación de la internalización de Cav1.

A pesar de que la forma activa de mDia1 rescató el defecto en la internalización de Cav1 mostrado en las células c-Abl/Arg dKO, la regulación de la actividad y localización de mDia1 por Abl parece no ser directa (Grevengoed y col., 2003). Este hecho es consistente con la incapacidad de detectar fosforilación endógena de mDia1 en residuos de Tyr y con el hecho de que mDia1 se fosforile sólo ligeramente tras la sobreexpresión de Abl (datos no mostrados). Es posible, no obstante, que las quinasas Abl regulen otros elementos implicados en el tráfico de Cav1. Por

ejemplo c-Abl fosforila tanto a Dyn2 (Singleton y col., 2009) como a Cav1 (Sanguinetti y Mastick, 2003). Un papel en la fosforilación de Cav1 también ha sido propuesto para Src (Glenney, 1989; Li y col., 1996b), cuya implicación en el proceso no pudo establecerse claramente en este trabajo debido a problemas técnicos. Cualquiera que sea el mecanismo por el que Abl regula este proceso, el hecho de que esta quinasa se active en respuesta a la adhesión celular en vez de a la pérdida de ésta (Lewis y col., 1996) sugiere que no desempeña un papel activo durante la suspensión, sino que su función podría ocurrir durante la adhesión, por ejemplo en la organización y distribución de Cav1 en la MP.

RhoA también resultó ser necesario para la regulación de la internalización de Cav1 en suspensión. Sin embargo, la forma activa de RhoA (RhoA-G14V) no rescató de forma eficiente el defecto en la internalización mostrado por las células c-Abl/Arg dKO (dato no mostrado), lo que sugiere que el efecto de estas proteínas durante el proceso de estudio es independiente o bien que RhoA no actúa *downstream* de las quinasas Abl. La acción de las proteínas Abl en la internalización de Cav1 es también independiente de otros de sus efectores, N-WASP, cortactina y el complejo WAVE/Abi, que son reguladores de actina implicados en la endocitosis mediada por clatrina (Boyle y col., 2007; Burton y col., 2005; Dai y Pendergast, 1995; Innocenti y col., 2005; Leng y col., 2005; Lommel y col., 2001), pero que no regulan la internalización de Cav1.

El estudio de la regulación de la internalización de Cav1 se extendió y profundizó para las filaminas, concretamente para la isoforma A. Los resultados obtenidos indican que ambas isoformas, A y B son necesarias para la regulación del proceso. Una posible explicación es que formen un complejo que para ser funcional requiera la participación de ambas isoformas. De hecho, hay evidencias de una regulación conjunta e interacción entre FLNa y FLNb en neuronas (Sheen y col., 2002). La regulación de las filaminas es, además, específica ya que el silenciamiento de las isoformas 1 y 4 de  $\alpha$ -actinina, otra proteína que entrecruza microfilamentos, es dispensable para la internalización de Cav1.

FLNa regula el tráfico de diversos receptores de membrana (Beekman y col., 2008; Minsaas y col.; Onoprishvili y col., 2003; Seck y col., 2003), así como la infección de SV40 dependiente de caveolas (Pelkmans y col., 2001). Asimismo, un estudio reciente basado en análisis de incorporación y transcitosis de albúmina muestra que FLNa regula la internalización de caveolas en células endoteliales (Sverdlov y col., 2009). Sin embargo, aunque se ha descrito que la transcitosis de albúmina se regula mediante caveolas, los animales deficientes en Cav1, y que por tanto carecen de caveolas endoteliales, tienen una concentración normal de albúmina en el fluido cerebrospinal y una presión oncótica (un componente de la presión osmótica que depende del transporte de albúmina a través del endotelio) extravascular normal (Drab y col., 2001; Parton, 2001).

Los datos mostrados en esta Tesis sugieren que la regulación de FLNa sobre la internalización de Cav1 sucede en distintas fases del proceso. Primero, la FLNa regula la distribución lineal de las vesículas de Cav1 a lo largo de las fibras de estrés. Segundo, regula el anclaje de las vesículas de Cav1 a la membrana plasmática. Y finalmente, es necesaria para la internalización de Cav1 desde la MP y su transporte hacia el compartimento endosomal de reciclaje Rab11+. Respecto a este último punto, cabe destacar que los resultados aquí mostrados indican que el papel de FLNa se requiere en los primeros pasos del proceso de internalización, de forma que en su ausencia la internalización de Cav1 no se produce correctamente y ésta queda retenida en las proximidades de la MP, con la consecuencia final de no acumularse en el compartimento de reciclaje perinuclear. Sin embargo, no se excluye que FLNa ejerza también un papel en fases más tardías del proceso, por ejemplo, en el transporte de las vesículas de Cav1 a través del citoesqueleto de actina y/o de los microtúbulos, a pesar de que no haya evidencias en la literatura que conecten la FLNa con el transporte vesicular por microtúbulos.

A pesar de no haber podido testar el papel de un mutante de FLNa sin el sitio de unión a Cav1, debido a problemas técnicos de expresión o estabilidad de la construcción (datos no mostrados), el hecho de que FLNa interaccione con Cav1 (Ravid y col., 2008; Stahlhut y van Deurs, 2000) además de la asociación descrita entre FLNa y actina (Wang y Singer, 1977), sugiere que la interacción entre estos elementos juega un papel importante en el tráfico de Cav1 y de las caveolas. En este sentido, la presencia de FLNa en las caveolas (Stahlhut y van Deurs, 2000) apoya esta idea.

Por otra parte, nuestros resultados indican que la función de FLNa requiere su fosforilación en Ser2152 y su capacidad de unirse a los microfilamentos de actina. Además, en este trabajo se observó que la fosforilación de FLNa en la Ser2152 es regulada de forma dinámica por PKC $\alpha$  durante la suspensión, con un incremento rápido (a los 5 minutos) y una disminución posterior (a los 60 minutos), y que estos cambios en fosforilación son necesarios para la internalización de Cav1. Puesto que se ha descrito que PKC $\alpha$  es capaz de fosforilar directamente el extremo carboxilo de FLNa, aunque sin identificar el residuo exacto (Kawamoto y Hidaka, 1984; Tigges y col., 2003), los resultados mostrados en este trabajo permiten sugerir que PKC $\alpha$  podría estar mediando la fosforilación directa del residuo Ser2152 de FLNa, así como establecer un nexo entre este evento y la internalización de Cav1. En línea con esta hipótesis, se ha descrito que la fosforilación en Ser2152 regula la función de FLNa (van der Flier y Sonnenberg, 2001), y que la fosforilación de FLNa en los residuos de serina o treonina es estimulada por factores de crecimiento (EGF and LPA) en fibroblastos (Ohta y Hartwig, 1995), promoviendo la inducción de la adhesión celular sobre bolas magnéticas recubiertas con colágeno (Glogauer y col., 1998). También se han observado cambios en el grado de fosforilación de FLNa tras la activación de las plaquetas (van der Flier y Sonnenberg, 2001). Sin embargo, la fosforilación de FLNa en

condiciones basales de adhesión, no se vió afectada por PKC, sugiriendo que ésta puede estar mediada por otras quinasas. Por otra parte también había sido propuesto que PKA fosforila a FLNa en la Ser2152 (Jay y col., 2004), pero los datos aquí presentados sugieren que PKA no está implicada en la fosforilación de FLNa inducida por la pérdida de adhesión celular.

Esta fosforilación de FLNa puede desempeñar diferentes funciones durante la internalización de Cav1. El hecho de que no sea necesaria para su interacción con Cav1 (Ravid y col., 2008) sugiere otro tipo de regulación diferente de la modulación de esta unión. A este respecto se plantean varias posibilidades en base a los datos publicados en la literatura y a las evidencias experimentales presentadas en este estudio:

- Una posibilidad sería que la fosforilación en Ser2152 afectase a la unión de FLNa con otras moléculas señalizadoras como las proteínas GTPasas y los reguladores de actina (Ueda y col., 1992; van der Flier y Sonnenberg, 2001; Yada y col., 1990), que podría facilitar la internalización de Cav1. En relación con esta hipótesis, la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de RalA (RalA-G23V), incapaz de disociarse de FLNa (Klaile y col., 2005), resultó en una disminución de la internalización de Cav1. Dado que FLNa y RalA se disocian tras la pérdida de adhesión celular (Klaile y col., 2005), los datos aquí mostrados sugieren que esta disociación podría ser necesaria para la función de FLNa sobre la internalización de Cav1. En este sentido, sería interesante estudiar si la fosforilación de FLNa en Ser2152 afecta a la afinidad de su unión con RalA.
- Otra posibilidad sería que la fosforilación de FLNa en la Ser2152 regulase directamente la forma de las caveolas a través de la modulación de la dinámica de membrana (García y col., 2006; Vadlamudi y col., 2002; Woo y col., 2004), lo que conferiría a la FLNa una función en la remodelación de membrana, también atribuida a FBP17 y cavina-2, proteínas que han resultado estar potencialmente implicadas en este proceso (Figura 23).
- Finalmente podría plantearse la opción de que la fosforilación en Ser2152 regulase la acción de FLNa sobre el citoesqueleto de actina. En este sentido, ya se ha descrito que la fosforilación de FLNa modula su capacidad de unir actina y su actividad de entrecruzar microfilamentos (Ohta y Hartwig, 1996; van der Flier y Sonnenberg, 2001; Wu y col., 1994; Zhuang y col., 1984), lo que a su vez podría facilitar el tráfico correcto de Cav1. Sería, por tanto, muy interesante analizar, con técnicas bioquímicas, los posibles cambios en la unión entre actina y los mutantes de FLNa-S2152A y S2152E o la forma WT.

La implicación de la fosforilación de FLNa en la Ser2152 también se observó en la regulación del co-alineamiento de Cav1 con el citoesqueleto de actina. Esta distribución ya había sido descrita (Stahlhut y van Deurs, 2000), pero no así la forma en que ocurre. Nuestros resultados no sólo indican que el alineamiento de Cav1 con la actina está mediado por FLNa, sino

que esta distribución de Cav1 es necesaria para su internalización. La conexión entre el alineamiento y anclaje de Cav1 sobre las fibras de estrés y el proceso de internalización de Cav1 viene apoyada por los experimentos de silenciamiento de FLNa, FLNb y RhoA, pero los resultados obtenidos con la forma mutada de RhoA constitutivamente activa (RhoA-G14V) sugiere que el incremento de anclaje de las vesículas de Cav1 no siempre correlaciona con un aumento de la internalización. Esto puede indicar que sólo los niveles fisiológicos de activación de RhoA permiten el anclaje óptimo de Cav1 a la actina, y que aunque el anclaje parece ser un prerrequisito para la internalización de Cav1, incrementos mayores no se corresponden con un incremento de la internalización. Más aún, en el caso del mutante no fosforilable de FLNa, un incremento en el anclaje viene acompañado de un defecto en la internalización de Cav1. Este descubrimiento, junto con el resultado obtenido con el mutante fosfomimético, sugiere que la fosforilación en FLNa en la Ser2152 puede regular el anclaje de las caveolas a la MP, y que la fosforilación y defosforilación cíclica de FLNa es necesaria para la internalización de caveolas.

Aunque la distribución lineal de las vesículas de Cav1 disminuyó considerablemente en ausencia de FLNa, ésta aún podía observarse, lo que sugiere que la FLNa puede ser uno de los componentes de un complejo que conecta las vesículas de Cav1 a las fibras de actina. FLNb también regula esta distribución de Cav1 y nuestros estudios de internalización muestran que en ausencia de cualquiera de estas isoformas se observa un defecto en la internalización de caveolas. Además, este defecto no se ve incrementado tras el KD doble, lo que sugiere un requerimiento conjunto de las isoformas A y B de filamina. Sin embargo, es posible que, en ausencia de FLNa, otras proteínas que entrecruzan filamentos de actina puedan compensar dicha falta.

Los resultados de TIRFm y de seguimiento de las trayectorias de vesículas con alta resolución espacio-temporal indican que FLNa está controlando la dinámica de internalización de vesículas de Cav1. Asimismo, los experimentos con CytD y LatA indican un requerimiento del citoesqueleto de actina en este proceso. Estas evidencias permiten sugerir que FLNa actuaría como elemento de conexión entre la Cav1 presente en las caveolas y el citoesqueleto de actina subyacente a la membrana plasmática. En este sentido, se ha observado que FLNa también es necesaria para el entrecruzamiento de filamentos de actina, así como para conectar el citoesqueleto de actina a otros dominios de membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos distintos a las caveolas (Head y col., 2006; Jiménez-Baranda y col., 2007; Mammoto y col., 2007; Tavano y col., 2006). En consonancia con estas evidencias, las células M2 y A7 presentan grandes diferencias morfológicas y en la distribución de actina. No obstante estas diferencias no se había descrito para otros tipos celulares donde la función de FLNa estaría también comprometida, como son las células KO para FLNa (Feng y col., 2006) y las KD para FLNa —endoteliales (Sverdlov y col., 2009) o HT1080 (Baldassarre y col., 2009) —. Sin

embargo, nuestros estudios de TIRFm parecen indicar que existen diferencias en la organización local de las fibras de actina próximas a la MP basal.

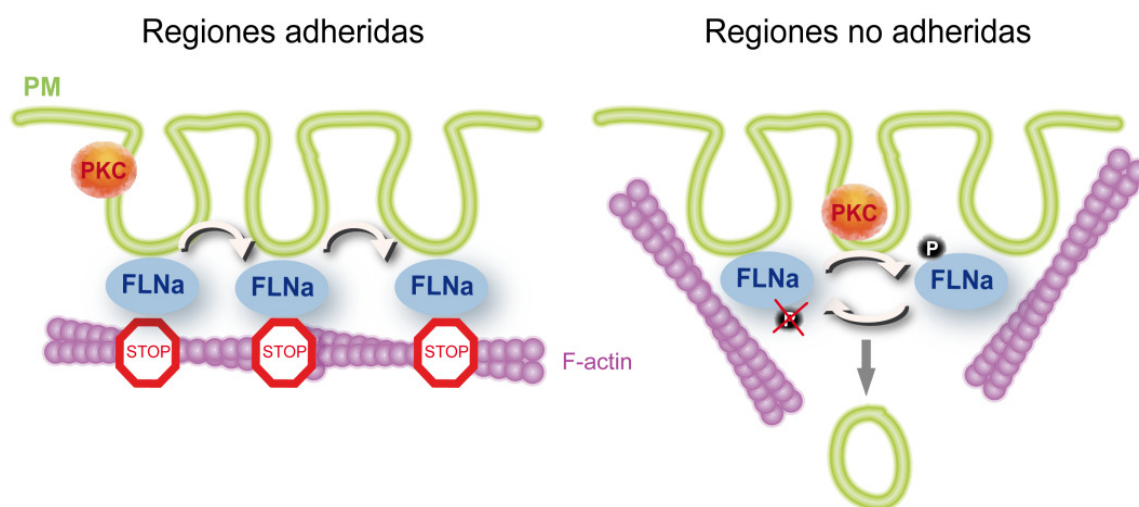
La resolución espacio-temporal inherente al seguimiento de trayectorias de vesículas ofreció una información valiosa referente a la población de vesículas de Cav1 en la MP. En presencia de FLNa, las vesículas de Cav1-GFP parecían llegar a unirse a la MP, bien como resultado de una interacción directa con FLNa, bien porque la FLNa promueve la unión de las vesículas a regiones específicas de la MP, que se corresponderían con puntos de anclaje. En las células silenciadas para FLNa, en cambio, aunque las vesículas de Cav1-GFP pueden encontrarse cercanas a la membrana basal, parecen no reconocer un sitio de anclaje específico. Este anclaje residual puede deberse a un silenciamiento incompleto de la proteína. Además, la disminución del anclaje de Cav1 tras los tratamientos con CytD o LatA apoya la idea de que el anclaje es mediado por el citoesqueleto de actina. Además, el hecho de que RhoA-G14V aumenta el anclaje de Cav1 sólo en presencia de FLNa apoya la idea de que el anclaje es facilitado por la estabilización de las fibras de estrés y que FLNa es necesaria para mediar este anclaje.

La restauración del anclaje en las células HeLa-ARNch-FLNa tras la expresión de FLNa<sup>R</sup>-WT, al contrario de lo observado con el mutante de FLNa de unión a actina FLNa<sup>R</sup>-ABD muestra que el anclaje de Cav1 al citoesqueleto de actina es mediado por FLNa, y más específicamente por su capacidad de unir actina. Asimismo, los resultados obtenidos usando la forma mutante de FLNa no fosforilable FLNa<sup>R</sup>-S2152A y la forma mutante de FLNa potencialmente fosfomimética FLNa<sup>R</sup>-S2152E sugieren que la fosforilación de FLNa en la Ser2152 altera su capacidad de asociación con el citoesqueleto de actina. De esta forma, el acusado incremento en el número de eventos de anclaje observado con el mutante no fosforilable dificultaría la liberación de las vesículas de Cav1 desde la MP. Por otro lado, el hecho de que el mutante fosfomimético no es capaz de restaurar el anclaje sugiere que la fosforilación constitutiva de la FLNa en residuo Ser2152 también afectaría negativamente al proceso de internalización, lo que indica que ninguna de estas dos condiciones extremas es favorable para la función normal de Cav1. Estas observaciones concuerdan con el incremento, sólo transitorio, observado en la fosforilación del residuo Ser2152 de la FLNa endógena en condiciones de adhesión.

El análisis de las trayectorias de las vesículas junto con los estudios de alineamiento de las vesículas de Cav1 sobre los filamentos de actina sugiere que la FLNa ancla las vesículas de Cav1 a la MP mediante su conexión con la actina cortical. Este papel de la FLNa podría explicar la asociación de las caveolas con las fibras de actina, demostrado por el grupo de Rob Parton mediante microscopía electrónica (Richter y col., 2008). Nuestros resultados sugieren que la FLNa es un potencial candidato para actuar como este conector físico.



En resumen, los datos referentes a FLNa mostrados en esta Tesis sugieren un modelo (Figura 53) en el cual la FLNa ancla las caveolas en la MP al favorecer su unión con los filamentos de actina mediante puntos de anclaje. Un cierto nivel de anclaje de Cav1 es necesario para su internalización tras la pérdida de adhesión celular. En células no adheridas, un ciclo de fosforilación y defosforilación de la FLNa en la Ser2152 dependiente de PKC $\alpha$  permitiría a las caveolas separarse de las MP e internalizarse hasta acumularse en un endosoma de reciclaje que colocaliza con Rab11. FLNa actúa, por tanto, como un elemento que une la Cav1 a los microfilamentos. Los cambios en esta asociación, necesaria para la correcta organización de las caveolas en la MP, que ocurren tras la fosforilación de FLNa parecen ser necesarios para la internalización de las vesículas de Cav1.

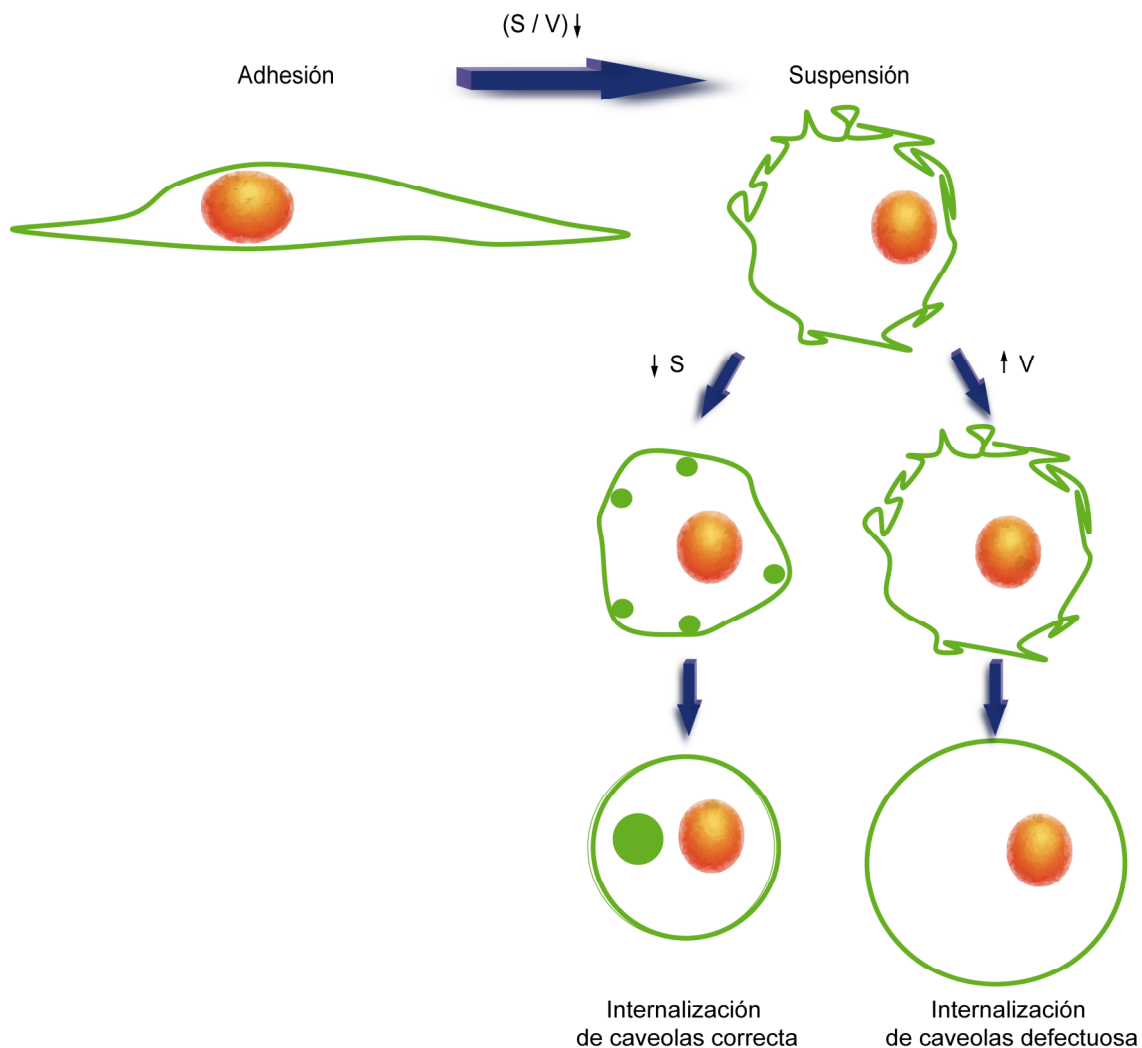


**Figura 53: Modelo explicativo de la internalización de las caveolas ancladas a la membrana plasmática regulada por FLNa y PKC $\alpha$ .** FLNa ancla las caveolas a la MP mediante la unión de éstas al citoesqueleto de actina. Inmediatamente tras la pérdida de adhesión celular, PKC $\alpha$  fosforila la FLNa y luego esta fosforilación vuelve a los niveles basales. Este ciclo de fosforilación y defosforilación permite la internalización de Cav1 hacia el endosoma de reciclaje.

Con respecto a la relevancia fisiológica de las funciones de Cav1 y FLNa, los resultados presentados en esta Tesis demuestran que estas proteínas están implicadas en el control de la proliferación celular, tanto en adhesión como en suspensión, a través de la regulación de la señalización de Rac1. La regulación de la proliferación celular por Cav1 y Rac1 ya había sido descrita anteriormente (Cerezo y col., 2009). Asimismo, también fue observada una alteración en la migración celular, otro proceso relacionado con la distribución local de Rac1, en ausencia de FLNa (Figura 50 y (Xu y col., 2010)). Sin embargo, y a pesar del incremento en la señalización de Rac1 en ausencia de FLNa, no se observaron alteraciones aparentes en la cantidad o distribución del citoesqueleto de actina tras la suspensión de las células sin FLNa. Esto puede deberse a la desaparición, durante la suspensión, de otros factores requeridos para la polimerización de actina.



Por otro lado, las evidencias aquí mostradas sugieren que la internalización masiva de Cav1 que tiene lugar en suspensión podría estar también implicada en la respuesta ante cambios de tensión en la membrana (Figura 54).



**Figura 54: Esquema de la internalización de membrana en respuesta a los cambios de tensión tras la pérdida de adhesión celular.** La disminución de la relación entre superficie y volumen ( $S/V$ ) en condiciones de pérdida de adhesión celular es corregida por las células mediante la internalización de membrana plasmática mediada por caveolas. En aquellas condiciones en las que la internalización de caveolas es defectuosa la célula no puede disminuir la superficie de membrana, por lo que ha de desarrollar otras estrategias para mantener la relación  $S/V$ , tales como el aumento de volumen.

Uno de los principales cambios que experimenta la célula cuando pierde la adhesión es una disminución de la relación entre superficie y volumen, que lleva consigo una disminución de la tensión de membrana (Colbert y col., 2009). Ya que muchas funciones celulares requieren la deformación de la membrana y cambios en la forma celular mediados por la tensión de membrana, como por ejemplo la migración y movilidad celular, la endocitosis y exocitosis, y la mitosis, se intuye la necesidad de regular esta tensión en la membrana plasmática para el mantenimiento de la homeostasis celular. En este sentido, el hecho que Cav1 se requiera para la

internalización de Tfn únicamente en suspensión sugiere que Cav1 es necesaria para regular la internalización de áreas de membrana plasmática cuando la célula pierde su adhesión celular. Así, el aumento en el tamaño celular observado en células que presentan defectos en la internalización de Cav1 sugiere que, en condiciones de no adhesión, estas células restablecen la tensión de membrana mediante el aumento del volumen (Figura 52B).

El papel de Cav1 en este proceso podría estar relacionado con la participación activa de las caveolas en esta internalización. Esta hipótesis concuerda con los resultados mostrados por Lamaze, Nassay y colaboradores (Sinha y col., 2011), que sugieren que las caveolas actúan como reservorio fisiológico de membrana para minimizar las variaciones en la tensión de membrana inducidas por estímulos de estrés mecánico. Datos del laboratorio también muestran que el estiramiento celular producido por el mutante activo de mDia1 induce el aplanamiento de caveolas (Echarri y col., *en revisión*).

Alternativamente, y no necesariamente en contradicción con la hipótesis anterior, Cav1 podría estar ejerciendo una función exclusiva en la recepción de los cambios de tensión de membrana, de forma independiente a su papel en el tráfico de caveolas. Esta interesante hipótesis está siendo testada en el laboratorio actualmente.

## 6. CONCLUSIONES

- I. La Cav1 se internaliza activamente tras la pérdida de adhesión a la MEC y se acumula en un compartimento de reciclaje positivo para Rab11 con localización perinuclear.**
- II. La internalización de Cav1 tras la pérdida de adhesión celular es un proceso altamente regulado en el que intervienen, entre otras, diversas proteínas relacionadas con la adhesión celular y con el citoesqueleto de actina.**
- III. Las tirosinas quinasas Abl, la GTPasa RhoA y la formina mDia1 promueven la internalización de Cav1 tras la pérdida de adhesión celular.**
- IV. Las filaminas promueven específicamente la distribución y el anclaje de las vesículas de Cav1 en adhesión y su internalización en suspensión.**
- V. La activación de RalA desempeña un papel en la regulación de la internalización de Cav1.**
- VI. La interacción de FLNa con los filamentos de actina es necesaria para la regulación de la distribución y el anclaje de las vesículas de Cav1 en adhesión y su internalización en suspensión.**
- VII. La fosforilación cíclica de FLNa en la Ser2152 es necesaria para la regulación de la distribución y anclaje de las vesículas de Cav1 sobre el citoesqueleto de actina en adhesión.**
- VIII. La fosforilación cíclica de FLNa en la Ser2152 mediada por PKC $\alpha$  es necesaria para la regulación de la internalización de Cav1 en suspensión.**
- IX. El papel del FLNa en la regulación de la internalización de Cav1 regula la señalización de Rac1/PAK1 y la proliferación celular.**

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- Aboulaich, N., Vainonen, J. P., Stralfors, P. y Vener, A. V. (2004). Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem J* 383, 237-48.
- Almeida, R. A., Dunlap, J. R. y Oliver, S. P. (2010). Binding of Host Factors Influences Internalization and Intracellular Trafficking of *Streptococcus uberis* in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Vet Med Int* 2010, 319192.
- Anderson, R. G. (1993). Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10909-13.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199-225.
- Assoian, R. K. y Schwartz, M. A. (2001). Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* 11, 48-53.
- Baig, A., Bao, X., Wolf, M. y Haslam, R. J. (2009). The platelet protein kinase C substrate pleckstrin binds directly to SDPR protein. *Platelets*, 1-12.
- Balasubramanian, N., Meier, J. A., Scott, D. W., Norambuena, A., White, M. A. y Schwartz, M. A. (2009). RalA-Exocyst Complex Regulates Integrin-Dependent Membrane Raft Exocytosis and Growth Signaling. *Curr Biol*.
- Balasubramanian, N., Scott, D. W., Castle, J. D., Casanova, J. E. y Schwartz, M. A. (2007). Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat Cell Biol* 9, 1381-91.
- Baldassarre, M., Razinia, Z., Burande, C. F., Lamsoul, I., Lutz, P. G. y Calderwood, D. A. (2009). Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration. *PLoS One* 4, e7830.
- Bastiani, M., Liu, L., Hill, M. M., Jedrychowski, M. P., Nixon, S. J., Lo, H. P., Abankwa, D., Luetterforst, R., Fernandez-Rojo, M., Breen, M. R., Gygi, S. P., Vinten, J., Walser, P. J., North, K. N., Hancock, J. F., Pilch, P. F. y Parton, R. G. (2009). MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J Cell Biol* 185, 1259-73.
- Bauer, P. M., Yu, J., Chen, Y., Hickey, R., Bernatchez, P. N., Looft-Wilson, R., Huang, Y., Giordano, F., Stan, R. V. y Sessa, W. C. (2005). Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 204-9.
- Beekman, J. M., van der Poel, C. E., van der Linden, J. A., van den Berg, D. L., van den Berghe, P. V., van de Winkel, J. G. y Leusen, J. H. (2008). Filamin A stabilizes Fc gamma RI surface expression and prevents its lysosomal routing. *J Immunol* 180, 3938-45.
- Bellanger, J. M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T. P. y Debant, A. (2000). The Rac- and RhoG-activating domain of the bifunctional GEF Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *FASEB meeting on The Ras superfamily of Small GTP-binding proteins* (abstract).

- Benga, L., Goethe, R., Rohde, M. y Valentin-Weigand, P. (2004). Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cell Microbiol* 6, 867-81.
- Bennett, J. P., Zaner, K. S. y Stossel, T. P. (1984). Isolation and some properties of macrophage alpha-actinin: evidence that it is not an actin gelling protein. *Biochemistry* 23, 5081-6.
- Bernatchez, P. N., Bauer, P. M., Yu, J., Prendergast, J. S., He, P. y Sessa, W. C. (2005). Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by caveolin-1 using cell-permeable peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 761-6.
- Boucrot, E., Howes, M. T., Kirchhausen, T. y Parton, R. G. (2011). Redistribution of caveolae during mitosis. *J Cell Sci* 124, 1965-72.
- Boyd, N. L., Park, H., Yi, H., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., Sykes, M. y Jo, H. (2003). Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1113-22.
- Boyle, S. N., Michaud, G. A., Schweitzer, B., Predki, P. F. y Koleske, A. J. (2007). A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinases in PDGF-induced dorsal-wave formation. *Curr Biol* 17, 445-51.
- Bradley, W. D. y Koleske, A. J. (2009). Regulation of cell migration and morphogenesis by Abl-family kinases: emerging mechanisms and physiological contexts. *J Cell Sci* 122, 3441-54.
- Brotschi, E. A., Hartwig, J. H. y Stossel, T. P. (1978). The gelation of actin by actin-binding protein. *J Biol Chem* 253, 8988-93.
- Brown, S. S. y Spudich, J. A. (1979). Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. *J Cell Biol* 83, 657-62.
- Browne, K. A., Johnstone, R. W., Jans, D. A. y Trapani, J. A. (2000). Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem* 275, 39262-6.
- Burton, E. A., Oliver, T. N. y Pendergast, A. M. (2005). Abl kinases regulate actin comet tail elongation via an N-WASP-dependent pathway. *Mol Cell Biol* 25, 8834-43.
- Cao, H., Courchesne, W. E. y Mastick, C. C. (2002). A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a Role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: Recruitment of C- terminal Src kinase. *J Biol Chem* 277, 22.
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P. y Sabatini, D. M. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100.



- Castrillon, D. H. y Wasserman, S. A. (1994). Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development* 120, 3367-77.
- Cerezo, A., Guadamillas, M. C., Goetz, J. G., Sanchez-Perales, S., Klein, E., Assoian, R. K. y del Pozo, M. A. (2009). The absence of caveolin-1 increases proliferation and anchorage-independent growth by a Rac-dependent, Erk-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 29, 5046-59.
- Colbert, M. J., Raegen, A. N., Fradin, C. y Dalnoki-Veress, K. (2009). Adhesion and membrane tension of single vesicles and living cells using a micropipette-based technique. *Eur Phys J E Soft Matter* 30, 117-21.
- Conrad, P. A., Smart, E. J., Ying, Y. S., Anderson, R. G. y Bloom, G. S. (1995). Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J Cell Biol* 131, 1421-33.
- Cosen-Binker, L. I. y Kapus, A. (2006). Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda)* 21, 352-61.
- Couet, J., Sargiacomo, M. y Lisanti, M. P. (1997). Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 272, 30429-38.
- Cox, D., Wessels, D., Soll, D. R., Hartwig, J. y Condeelis, J. (1996). Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility, and phagocytosis defects of ABP-120- *Dictyostelium* mutants. *Mol Biol Cell* 7, 803-23.
- Cunningham, C. C., Gorlin, J. B., Kwiatkowski, D. J., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Byers, H. R. y Stossel, T. P. (1992). Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255, 325-7.
- Chen, M. y Stracher, A. (1989). In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J Biol Chem* 264, 14282-9.
- Cheng, Z. J., Singh, R. D., Sharma, D. K., Holicky, E. L., Hanada, K., Marks, D. L. y Pagano, R. E. (2006). Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol Biol Cell* 17, 3197-210.
- Chidlow, J. H., Jr. y Sessa, W. C. (2010). Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res* 86, 219-25.
- Dai, Z. y Pendergast, A. M. (1995). Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev* 9, 2569-82.

- Das, K., Lewis, R. Y., Scherer, P. E. y Lisanti, M. P. (1999). The membrane-spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J Biol Chem* 274, 18721-8.
- Davies, P. J., Wallach, D., Willingham, M. C., Pastan, I., Yamaguchi, M. y Robson, R. M. (1978). Filamin-actin interaction. Dissociation of binding from gelation by  $\text{Ca}^{2+}$ -activated proteolysis. *J Biol Chem* 253, 4036-42.
- del Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H. H., Anderson, R. G. y Schwartz, M. A. (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* 303, 839-42.
- del Pozo, M. A., Balasubramanian, N., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Grande-Garcia, A., Anderson, R. G. y Schwartz, M. A. (2005). Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* 7, 901-8.
- del Pozo, M. A., Kiosses, W. B., Alderson, N., Meller, N., Hahn, K. M. y Schwartz, M. A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of RhoGDI. *Nature Cell Biol.* 4, 232-239.
- del Pozo, M. A., Price, L. S., Alderson, N. B., Ren, X. D. y Schwartz, M. A. (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *Embo J* 19, 2008-14.
- del Pozo, M. A. y Schwartz, M. A. (2007). Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol* 17, 246-50.
- del Pozo, M. A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J. M. y Sánchez-Madrid, F. (1999). Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29, 3609-20.
- Dietzen, D. J., Hastings, W. R. y Lublin, D. M. (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270, 6838-42.
- Doherty, G. J. y McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857-902.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C. y col. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-52.
- Dupree, P., Parton, R. G., Raposo, G., Kurzchalia, T. V. y Simons, K. (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J* 12, 1597-605.

- Echarri, A. y Del Pozo, M. A. (2006). Caveolae internalization regulates integrin-dependent signaling pathways. *Cell Cycle* 5, 2179-82.
- Echarri, A., Muriel, O. y Del Pozo, M. A. (2007). Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. *Semin Cell Dev Biol* 18, 627-37.
- Feng, Y., Chen, M. H., Moskowitz, I. P., Mendonza, A. M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D. J. y Walsh, C. A. (2006). Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19836-41.
- Feng, Y. y Walsh, C. A. (2004). The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol* 6, 1034-8.
- Fernandez, M. A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Nixon, S. J., Ferguson, C., Kurzchalia, T., Tebar, F., Enrich, C., Parton, R. G. y Pol, A. (2006). Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 313, 1628-32.
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A. y Michel, T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 22810-4.
- Foster, L. J., De Hoog, C. L. y Mann, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5813-8.
- Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E. H., De Camilli, P. y Unger, V. M. (2008). Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell* 132, 807-17.
- Fu, Y., Hoang, A., Escher, G., Parton, R. G., Krozowski, Z. y Sviridov, D. (2004). Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J Biol Chem* 279, 14140-6.
- Galbiati, F., Engelman, J. A., Volonte, D., Zhang, X. L., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Edelmann, W. y Lisanti, M. P. (2001). Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 276, 21425-33.
- Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J. A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R. G. y Lisanti, M. P. (1998). Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *Embo J.* 17, 6633-6648.
- Galbiati, F., Volonte, D., Minetti, C., Chu, J. B. y Lisanti, M. P. (1999). Phenotypic behavior of caveolin-3 mutations that cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGMD-1C caveolin-3 mutants within the golgi complex. *J Biol Chem* 274, 25632-41.

- Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J. E. y Sessa, W. C. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6448-53.
- Garcia, E., Stracher, A. y Jay, D. (2006). Calcineurin dephosphorylates the C-terminal region of filamin in an important regulatory site: a possible mechanism for filamin mobilization and cell signaling. *Arch Biochem Biophys* 446, 140-50.
- Gill, D. M. (1976). The arrangement of subunits in cholera toxin. *Biochemistry* 15, 1242-8.
- Glenney, J. R., Jr. (1989). Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 264, 20163-6.
- Glogauer, M., Arora, P., Chou, D., Janmey, P. A., Downey, G. P. y McCulloch, C. A. (1998). The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J Biol Chem* 273, 1689-98.
- Goetz, J. G., Minger, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A., Cerezo, A., Klein-Szanto, A. J. P., García, R., Keely, P., Sánchez-Mateos, P., Cukierman, E., y del Pozo, M. A. (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal Caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell (en prensa)*.
- Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J. y Hartwig, J. H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol* 111, 1089-105.
- Grande-García, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N. B., Waterman-Storer, C. M., Valdivielso, J. M. y del Pozo, M. A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* 177, 683-94.
- Grevengoed, E. E., Fox, D. T., Gates, J. y Peifer, M. (2003). Balancing different types of actin polymerization at distinct sites: roles for Abelson kinase and Enabled. *J Cell Biol* 163, 1267-79.
- Guan, J. L. (2004). Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* 303, 773-4.
- Gustincich, S. y Schneider, C. (1993). Serum deprivation response gene is induced by serum starvation but not by contact inhibition. *Cell Growth Differ* 4, 753-60.
- Hansen, C. G., Bright, N. A., Howard, G. y Nichols, B. J. (2009). SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat Cell Biol* 11, 807-14.
- Hansen, C. G. y Nichols, B. J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 20, 177-86.
- Hayashi, K., Matsuda, S., Machida, K., Yamamoto, T., Fukuda, Y., Nimura, Y., Hayakawa, T. y Hamaguchi, M. (2001). Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 61, 2361-4.

- Hayashi, Y. K., Matsuda, C., Ogawa, M., Goto, K., Tominaga, K., Mitsuhashi, S., Park, Y. E., Nonaka, I., Hino-Fukuyo, N., Haginoya, K. y col. (2009). Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest* 119, 2623-33.
- Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Murray, F., Swaney, J. S., Niesman, I. R., Farquhar, M. G. y Insel, P. A. (2006). Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem* 281, 26391-9.
- Hellriegel, C. K., Johanna; Brauchle, Christoph,. (2005). Tracking of single molecules as a powerful method to characterize diffusivity of organic species in mesoporous materials. *New Journal of Physics* 7.
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J. y McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141, 85-99.
- Henson, P. M. (2005). Engulfment: ingestion and migration with Rac, Rho and TRIO. *Curr Biol* 15, R29-30.
- Hernandez, S. E., Krishnaswami, M., Miller, A. L. y Koleske, A. J. (2004). How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends Cell Biol* 14, 36-44.
- Hill, M. M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S. J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V. M., Martin, S. y col. (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132, 113-24.
- Ho, H. Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A. M., Le, M., Li, J., Gygi, S. P. y Kirschner, M. W. (2004). Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118, 203-16.
- Hock, R. S., Davis, G. y Speicher, D. W. (1990). Purification of human smooth muscle filamin and characterization of structural domains and functional sites. *Biochemistry* 29, 9441-51.
- Howe, A. K. y Juliano, R. L. (2000). Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* 2, 593-600.
- Howes, M. T., Kirkham, M., Riches, J., Cortese, K., Walser, P. J., Simpson, F., Hill, M. M., Jones, A., Lundmark, R., Lindsay, M. R., Hernández-Deviez, D. J., Hadzic, G., McCluskey, A., Bashir, R., Liu, L., Pilch, P., McMahon, H., Robinson, P. J., Hancock, J. F., Mayor, S., y Parton, R. G. (2010). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol* 190, 675-91.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-87.

- Innocenti, M., Gerboth, S., Rottner, K., Lai, F. P., Hertzog, M., Stradal, T. E., Frittoli, E., Didry, D., Polo, S., Disanza, A. y col. (2005). Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat Cell Biol* 7, 969-76.
- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L. B., Steffen, A., Stradal, T. E., Di Fiore, P. P., Carlier, M. F. y Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* 6, 319-27.
- Isenberg, G. (1991). Actin binding proteins--lipid interactions. *J Muscle Res Cell Motil* 12, 136-44.
- Isenberg, G. y Niggli, V. (1998). Interaction of cytoskeletal proteins with membrane lipids. *Int Rev Cytol* 178, 73-125.
- Izumi, Y., Hirai, S., Tamai, Y., Fujise-Matsuoka, A., Nishimura, Y. y Ohno, S. (1997). A protein kinase Cdelta-binding protein SRBC whose expression is induced by serum starvation. *J Biol Chem* 272, 7381-9.
- Janmey, P. A., Hvidt, S., Lamb, J. y Stossel, T. P. (1990). Resemblance of actin-binding protein/actin gels to covalently crosslinked networks. *Nature* 345, 89-92.
- Jay, D., Garcia, E. J. y de la Luz Ibarra, M. (2004). In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. *Mol Cell Biochem* 260, 49-53.
- Jiménez-Baranda, S., Gómez-Mouton, C., Rojas, A., Martínez-Prats, L., Mira, E., Ana Lacalle, R., Valencia, A., Dimitrov, D. S., Viola, A., Delgado, R., Martínez, A. C. y Mañes, S. (2007). Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat Cell Biol* 9, 838-46.
- Kamioka, Y., Fukuhara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Masuda, M., Matsuda, M. y Mochizuki, N. (2004). A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J Biol Chem* 279, 40091-9.
- Kang, Y. S., Ko, Y. G. y Seo, J. S. (2000). Caveolin internalization by heat shock or hyperosmotic shock. *Exp Cell Res* 255, 221-8.
- Kanzaki, M. y Pessin, J. E. (2002). Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes. *J Biol Chem* 277, 25867-9.
- Kawamoto, S. y Hidaka, H. (1984). Ca<sup>2+</sup>-activated, phospholipid-dependent protein kinase catalyzes the phosphorylation of actin-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 118, 736-42.
- Klaile, E., Muller, M. M., Kannicht, C., Singer, B. B. y Lucka, L. (2005). CEACAM1 functionally interacts with filamin A and exerts a dual role in the regulation of cell migration. *J Cell Sci* 118, 5513-24.
- Krief, S., Faivre, J. F., Robert, P., Le Douarin, B., Brument-Larignon, N., Lefrere, I., Bouzyk, M. M., Anderson, K. M., Greller, L. D., Tobin, F. L., Souchet, M. y Bril, A. (1999). Identification and

characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 274, 36592-600.

Kumari, S., Mg, S. y Mayor, S. (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* 20, 256-75.

Kurzchalia, T. V. y Parton, R. G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 424-431.

Labrecque, L., Nyalendo, C., Langlois, S., Durocher, Y., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D. y Beliveau, R. (2004). Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 279, 52132-40.

Le Roy, C. y Wrana, J. L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112-26.

Lee, H., Park, D. S., Razani, B., Russell, R. G., Pestell, R. G. y Lisanti, M. P. (2002). Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol* 161, 1357-69.

Lee, H., Volonte, D., Galbiati, F., Iyengar, P., Lublin, D. M., Bregman, D. B., Wilson, M. T., Campos-Gonzalez, R., Bouzahzah, B., Pestell, R. G., Sherer, P. E. y Lisanti, M. P. (2000). Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav- 1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 14, 1750-75.

Lee, H., Xie, L., Luo, Y., Lee, S. Y., Lawrence, D. S., Wang, X. B., Sotgia, F., Lisanti, M. P. y Zhang, Z. Y. (2006). Identification of phosphocaveolin-1 as a novel protein tyrosine phosphatase 1B substrate. *Biochemistry* 45, 234-40.

Lee, S. H. y Domínguez, R. (2010). Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 29, 311-25.

Leng, Y., Zhang, J., Badour, K., Arpaia, E., Freeman, S., Cheung, P., Siu, M. y Siminovitch, K. (2005). Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1098-103.

Leonardi, A., Ellinger-Ziegelbauer, H., Franzoso, G., Brown, K. y Siebenlist, U. (2000). Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J Biol Chem* 275, 271-8.

Lewis, J. M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M. A. y Wang, J. Y. (1996). Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15174-9.



- Li, M., Bermak, J. C., Wang, Z. W. y Zhou, Q. Y. (2000). Modulation of dopamine D(2) receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280). *Mol Pharmacol* 57, 446-52.
- Li, S., Couet, J. y Lisanti, M. P. (1996a). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271, 29182-90.
- Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J. E., Hansen, S. H., Nishimoto, I. y Lisanti, M. P. (1995). Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* 270, 15693-701.
- Li, S., Seitz, R. y Lisanti, M. P. (1996b). Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem* 271, 3863-8.
- Liu, G., Thomas, L., Warren, R. A., Enns, C. A., Cunningham, C. C., Hartwig, J. H. y Thomas, G. (1997). Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J Cell Biol* 139, 1719-33.
- Liu, L., Brown, D., McKee, M., Lebrasseur, N. K., Yang, D., Albrecht, K. H., Ravid, K. y Pilch, P. F. (2008). Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab* 8, 310-7.
- Liu, L. y Pilch, P. F. (2008). A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J Biol Chem* 283, 4314-22.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L. y Darnell, J. (2003). Molecular Cell Biology: Editorial W. H. Freeman (libro).
- Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J. y Kuhn, R. (2001). Actin pedestal formation by enteropathogenic Escherichia coli and intracellular motility of Shigella flexneri are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep* 2, 850-7.
- Loo, D. T., Kanner, S. B. y Aruffo, A. (1998). Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J Biol Chem* 273, 23304-12.
- Maestrini, E., Patrosso, C., Mancini, M., Rivella, S., Rocchi, M., Repetto, M., Villa, A., Frattini, A., Zoppe, M., Vezzoni, P. y col. (1993). Mapping of two genes encoding isoforms of the actin binding protein ABP-280, a dystrophin like protein, to Xq28 and to chromosome 7. *Hum Mol Genet* 2, 761-6.
- Mammoto, A., Huang, S. y Ingber, D. E. (2007). Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts. *J Cell Sci* 120, 456-67.
- Marti, A., Luo, Z., Cunningham, C., Ohta, Y., Hartwig, J., Stossel, T. P., Kyriakis, J. M. y Avruch, J. (1997). Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1

and is required for tumor necrosis factor- $\alpha$  activation of SAPK in melanoma cells. *J Biol Chem* 272, 2620-8.

McMahon, K. A., Zajicek, H., Li, W. P., Peyton, M. J., Minna, J. D., Hernandez, V. J., Luby-Phelps, K. y Anderson, R. G. (2009). SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J* 28, 1001-15.

Megason, S. G. y Fraser, S. E. (2003). Digitizing life at the level of the cell: high-performance laser-scanning microscopy and image analysis for in toto imaging of development. *Mech Dev* 120, 1407-20.

Meyer, S. C., Zuerbig, S., Cunningham, C. C., Hartwig, J. H., Bissell, T., Gardner, K. y Fox, J. E. (1997). Identification of the region in actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein IB $\alpha$ . *J Biol Chem* 272, 2914-9.

Mineo, C., Ying, Y. S., Chapline, C., Jaken, S. y Anderson, R. G. (1998). Targeting of protein kinase C $\alpha$  to caveolae. *J Cell Biol* 141, 601-10.

Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F. D., Lisanti, M. P. y Zara, F. (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 18, 365-8.

Minsaas, L., Planaguma, J., Madziva, M., Krakstad, B. F., Masia-Balague, M., Katz, A. A. y Aragay, A. M. (2010). Filamin a binds to CCR2B and regulates its internalization. *PLoS One* 5, e12212.

Minshall, R. D., Tiruppathi, C., Vogel, S. M., Niles, W. D., Gilchrist, A., Hamm, H. E. y Malik, A. B. (2000). Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol* 150, 1057-70.

Mogelsvang, S., Marsh, B. J., Ladinsky, M. S. y Howell, K. E. (2004). Predicting function from structure: 3D structure studies of the mammalian Golgi complex. *Traffic* 5, 338-45.

Monier, S., Dietzen, D. J., Hastings, W. R., Lublin, D. M. y Kurzchalia, T. V. (1996). Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett* 388, 143-9.

Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A. y Kurzchalia, T. V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6, 911-27.

Mora, R., Bonilha, V. L., Marmorstein, A., Scherer, P. E., Brown, D., Lisanti, M. P. y Rodriguez-Boulan, E. (1999). Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J Biol Chem* 274, 25708-17.

- Moser, M., Legate, K. R., Zent, R. y Fassler, R. (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324, 895-9.
- Mundy, D. I., Machleidt, T., Ying, Y. S., Anderson, R. G. y Bloom, G. S. (2002). Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 115, 4327-39.
- Nabi, I. R. (2009). Cavin fever: regulating caveolae. *Nat Cell Biol* 11, 789-91.
- Nichols, B. (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci* 116, 4707-14.
- Ogata, T., Ueyama, T., Isodono, K., Tagawa, M., Takehara, N., Kawashima, T., Harada, K., Takahashi, T., Shioi, T., Matsubara, H. y Oh, H. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Mol Cell Biol* 28, 3424-36.
- Ohta, Y. y Hartwig, J. H. (1995). Actin filament cross-linking by chicken gizzard filamin is regulated by phosphorylation in vitro. *Biochemistry* 34, 6745-54.
- Ohta, Y. y Hartwig, J. H. (1996). Phosphorylation of actin-binding protein 280 by growth factors is mediated by p90 ribosomal protein S6 kinase. *J Biol Chem* 271, 11858-64.
- Ohta, Y., Stossel, T. P. y Hartwig, J. H. (1991). Ligand-sensitive binding of actin-binding protein to immunoglobulin G Fc receptor I (Fc gamma RI). *Cell* 67, 275-82.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H. y Stossel, T. P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2122-2128.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. y Lisanti, M. P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 5419-5422.
- Onoprishvili, I., Andria, M. L., Kramer, H. K., Ancevska-Taneva, N., Hiller, J. M. y Simon, E. J. (2003). Interaction between the mu opioid receptor and filamin A is involved in receptor regulation and trafficking. *Mol Pharmacol* 64, 1092-100.
- Ott, I., Fischer, E. G., Miyagi, Y., Mueller, B. M. y Ruf, W. (1998). A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol* 140, 1241-53.
- Ozanne, D. M., Brady, M. E., Cook, S., Gaughan, L., Neal, D. E. y Robson, C. N. (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol* 14, 1618-26.
- Palade, G. E. (1953). Fine structure of Blood Capillaries. *J Appl Phys* 24, 1424 (abstract).

- Palazzo, A. F., Eng, C. H., Schlaepfer, D. D., Marcantonio, E. E. y Gundersen, G. G. (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* 303, 836-9.
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J. A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P. E., Mora, R., Rodríguez-Boulán, E., Peschle, C. y Lisanti, M. P. (1999). Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem* 274, 25718-25.
- Parrini, M. C., Camonis, J., Matsuda, M. y de Gunzburg, J. (2009). Dissecting activation of the PAK1 kinase at protrusions in living cells. *J Biol Chem* 284, 24133-43.
- Parton, R. G. (1994). Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 42, 155-66.
- Parton, R. G. (2001). Cell biology. Life without caveolae. *Science* 293, 2404-5.
- Parton, R. G., Joggerst, B. y Simons, K. (1994). Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 127, 1199-215.
- Parton, R. G. y Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 185-94.
- Pear, W. S., Miller, J. P., Xu, L., Pui, J. C., Soffer, B., Quackenbush, R. C., Pendergast, A. M., Bronson, R., Aster, J. C., Scott, M. L. y Baltimore, D. (1998). Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 92, 3780-92.
- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E. y Zerial, M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436, 78-86.
- Pelkmans, L. y Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3, 311-20.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. y Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3, 473-83.
- Pelkmans, L., Puntener, D. y Helenius, A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 296, 535-9.
- Pelkmans, L. y Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436, 128-33.
- Pendergast, A. M. (2002). The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* 85, 51-100.

- Petrecca, K., Miller, D. M. y Shrier, A. (2000). Localization and enhanced current density of the Kv4.2 potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin. *J Neurosci* 20, 8736-44.
- Plattner, R., Irvin, B. J., Guo, S., Blackburn, K., Kazlauskas, A., Abraham, R. T., York, J. D. y Pendergast, A. M. (2003). A new link between the c-Abl tyrosine kinase and phosphoinositide signalling through PLC-gamma1. *Nat Cell Biol* 5, 309-19.
- Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, 451-77.
- Pollard, T. D. y Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-12.
- Predescu, S. A., Predescu, D. N., Timblin, B. K., Stan, R. V. y Malik, A. B. (2003). Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 14, 4997-5010.
- Prieto-Sanchez, R. M., Berenjeno, I. M. y Bustelo, X. R. (2006). Involvement of the Rho/Rac family member RhoG in caveolar endocytosis. *Oncogene* 25, 2961-73.
- Rahman, A. y Sward, K. (2009). The role of caveolin-1 in cardiovascular regulation. *Acta Physiol (Oxf)* 195, 231-45.
- Ravid, D., Chuderland, D., Landsman, L., Lavie, Y., Reich, R. y Liscovitch, M. (2008). Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration. *Exp Cell Res* 314, 2762-73.
- Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., Macaluso, F., Russell, R. G., Li, M., Pestell, R. G., Di Vizio, D., Hou, H. Jr., Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G. J., Edelmann, W. y Lisanti, M. P. (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276, 38121-38.
- Razani, B., Wang, X. B., Engelman, J. A., Battista, M., Lagaud, G., Zhang, X. L., Kneitz, B., Hou, H., Jr., Christ, G. J., Edelmann, W. y Lisanti, M. P. (2002a). Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 22, 2329-44.
- Razani, B., Woodman, S. E. y Lisanti, M. P. (2002b). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54, 431-67.
- Ren, X. D., Wang, R., Li, Q., Kahek, L. A., Kaibuchi, K. y Clark, R. A. (2004). Disruption of Rho signal transduction upon cell detachment. *J Cell Sci* 117, 3511-8.
- Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M. R., Morgan, G. P., Marsh, B. J. y Parton, R. G. (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic* 9, 893-909.

- Rizzo, V., Sung, A., Oh, P. y Schnitzer, J. E. (1998). Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J Biol Chem* 273, 26323-9.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. y Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-82.
- Sanguinetti, A. R., Cao, H. y Corley Mastick, C. (2003). Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem J* 376, 159-68.
- Sanguinetti, A. R. y Mastick, C. C. (2003). c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal* 15, 289-98.
- Saxena, S., Jonsson, Z. O. y Dutta, A. (2003). Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 278, 44312-9.
- Saxton, M. J. y Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26, 373-99.
- Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P. y Suetsugu, S. (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol* 18, 52-60.
- Scheiffele, P., Verkade, P., Fra, A. M., Virta, H., Simons, K. y Ikonen, E. (1998). Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol* 140, 795-806.
- Scherer, P. E., Lewis, R. Y., Volonte, D., Engelman, J. A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D. S., van Donselaar, E., Peters, P. y Lisanti, M. P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272, 29337-46.
- Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H. F. y Lisanti, M. P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 131-5.
- Scherer, P. E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H. F. y Lisanti, M. P. (1995). Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 270, 16395-401.
- Schlegel, A., Arvan, P. y Lisanti, M. P. (2001). Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276, 4398-408.
- Schlegel, A., Schwab, R. B., Scherer, P. E. y Lisanti, M. P. (1999). A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. *J Biol Chem* 274, 22660-7.

- Seck, T., Baron, R. y Horne, W. C. (2003). Binding of filamin to the C-terminal tail of the calcitonin receptor controls recycling. *J Biol Chem* 278, 10408-16.
- Sentein, P. (1979). Nocodazole, an antitubulin substance, whose action is different from that of colchicine. Effects on segmentation mitoses. I.--Light microscopy. *Arch Biol (Liege)* 90, 459-79.
- Shajahan, A. N., Timblin, B. K., Sandoval, R., Tiruppathi, C., Malik, A. B. y Minshall, R. D. (2004). Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 279, 20392-400.
- Sharma, C. P., Ezzell, R. M. y Arnaout, M. A. (1995). Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J Immunol* 154, 3461-70.
- Sharma, D. K., Brown, J. C., Choudhury, A., Peterson, T. E., Holicky, E., Marks, D. L., Simari, R., Parton, R. G. y Pagano, R. E. (2004). Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol Biol Cell* 15, 3114-22.
- Shatz, M. y Liscovitch, M. (2008). Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *Int J Radiat Biol* 84, 177-89.
- Shaul, P. W. y Anderson, R. G. (1998). Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275, L843-51.
- Sheen, V. L., Feng, Y., Graham, D., Takafuta, T., Shapiro, S. S. y Walsh, C. A. (2002). Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Hum Mol Genet* 11, 2845-54.
- Shin, J. S., Gao, Z. y Abraham, S. N. (2000). Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* 289, 785-8.
- Simons, K. y Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 688-99.
- Simons, K. y Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-72.
- Simons, K. y Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-9.
- Singer, S. J. y Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-31.
- Singleton, P. A., Pendyala, S., Gorshkova, I. A., Mambetsariev, N., Moitra, J., Garcia, J. G. y Natarajan, V. (2009). Dynamin 2 and c-Abl are novel regulators of hyperoxia-mediated NADPH oxidase activation and reactive oxygen species production in caveolin-enriched microdomains of the endothelium. *J Biol Chem* 284, 34964-75.



- Sinha, B., Koster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C. y Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144, 402-13.
- Smart, E. J., Ying, Y., Donzell, W. C. y Anderson, R. G. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271, 29427-35.
- Smart, E. J., Ying, Y. S. y Anderson, R. G. (1995). Hormonal regulation of caveolae internalization. *J Cell Biol* 131, 929-38.
- Song, K. S., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Parenti, M. y Lisanti, M. P. (1997). Targeting of a G alpha subunit (G $\alpha$ 12) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 43, 293-303.
- Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D. S. y Lisanti, M. P. (1996). Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 271, 15160-5.
- Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. y Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149, 901-14.
- Spisni, E., Tomasi, V., Cestaro, A. y Tosatto, S. C. (2005). Structural insights into the function of human caveolin 1. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1383-90.
- Stahlhut, M. y van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* 11, 325-337.
- Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M. y Shapiro, S. S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 138-45.
- Stossel, T. P. y Hartwig, J. H. (1975). Interactions between actin, myosin, and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages. Alveolar macrophage myosin Mg<sup>2+</sup>-adenosine triphosphatase requires a cofactor for activation by actin. *J Biol Chem* 250, 5706-12.
- Sugihara, K., Asano, S., Tanaka, K., Iwamatsu, A., Okawa, K. y Ohta, Y. (2002). The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat Cell Biol* 4, 73-8.
- Sunaga, N., Miyajima, K., Suzuki, M., Sato, M., White, M. A., Ramirez, R. D., Shay, J. W., Gazdar, A. F. y Minna, J. D. (2004). Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Res* 64, 4277-85.

- Sverdlov, M., Shinin, V., Place, A. T., Castellon, M. y Minshall, R. D. (2009). Filamin A regulates caveolae internalization and trafficking in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 20, 4531-40.
- Taagepera, S., McDonald, D., Loeb, J. E., Whitaker, L. L., McElroy, A. K., Wang, J. Y. y Hope, T. J. (1998). Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7457-62.
- Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L. y Helenius, A. (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* 170, 769-79.
- Tagawa, M., Ueyama, T., Ogata, T., Takehara, N., Nakajima, N., Isodono, K., Asada, S., Takahashi, T., Matsubara, H. y Oh, H. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C490-8.
- Takafuta, T., Wu, G., Murphy, G. F. y Shapiro, S. S. (1998). Human beta-filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha. *J Biol Chem* 273, 17531-8.
- Takagi, J. (2007). Structural basis for ligand recognition by integrins. *Curr Opin Cell Biol* 19, 557-64.
- Takenawa, T. y Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 37-48.
- Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F. y Lisanti, M. P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271, 2255-61.
- Tavano, R., Contento, R. L., Baranda, S. J., Soligo, M., Tuosto, L., Manes, S. y Viola, A. (2006). CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol* 8, 1270-6.
- Thompson, T. G., Chan, Y. M., Hack, A. A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H. G., McNally, E. M., Watkins, S. y Kunkel, L. M. (2000). Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol* 148, 115-26.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M. y van Deurs, B. (2002). Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 13, 238-50.
- Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B. M. y Ziegler, W. H. (2003). The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha. *J Biol Chem* 278, 23561-9.

- Ueda, M., Oho, C., Takisawa, H. y Ogihara, S. (1992). Interaction of the low-molecular-mass, guanine-nucleotide-binding protein with the actin-binding protein and its modulation by the cAMP-dependent protein kinase in bovine platelets. *Eur J Biochem* 203, 347-52.
- Uittenbogaard, A. y Smart, E. J. (2000). Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem* 275, 25595-9.
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P. y Kumar, R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* 4, 681-90.
- van der Flier, A. y Sonnenberg, A. (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* 1538, 99-117.
- Van Etten, R. A., Jackson, P. K., Baltimore, D., Sanders, M. C., Matsudaira, P. T. y Janmey, P. A. (1994). The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol* 124, 325-40.
- Vinten, J., Johnsen, A. H., Roepstorff, P., Harpoth, J. y Trandum-Jensen, J. (2005). Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1717, 34-40.
- Waller, B. J. y Alberts, A. S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 13, 435-46.
- Wang, K. y Singer, S. J. (1977). Interaction of filamin with f-actin in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2021-5.
- Wang, Y., Miller, A. L., Mooseker, M. S. y Koleske, A. J. (2001). The Abl-related gene (Arg) nonreceptor tyrosine kinase uses two F-actin-binding domains to bundle F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14865-70.
- Weber, G. (2007). *Molecular Mechanisms of Cancer*: Editorial Springer (libro).
- Wheater, P., Burkitt, H. y Daniels, V. (1987). *Histología Funcional*: Editorial JIMS (libro).
- Williams, T. M. y Lisanti, M. P. (2004). The caveolin proteins. *Genome Biol* 5, 214.
- Williams, T. M. y Lisanti, M. P. (2005). Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C494-506.
- Woo, M. S., Ohta, Y., Rabinovitz, I., Stossel, T. P. y Blenis, J. (2004). Ribosomal S6 kinase (RSK) regulates phosphorylation of filamin A on an important regulatory site. *Mol Cell Biol* 24, 3025-35.
- Wu, M. P., Jay, D. y Stracher, A. (1994). Existence of multiple phosphorylated forms of human platelet actin binding protein. *Cell Mol Biol Res* 40, 351-7.

- Xu, X. L., Wu, L. C., Du, F., Davis, A., Peyton, M., Tomizawa, Y., Maitra, A., Tomlinson, G., Gazdar, A. F., Weissman, B. E., Bowcock, A. M., Baer, R. y Minna, L. D. (2001). Inactivation of human SRBC, located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region, in breast and lung cancers. *Cancer Res* 61, 7943-9.
- Xu, Y., Bismar, T. A., Su, J., Xu, B., Kristiansen, G., Varga, Z., Teng, L., Ingber, D. E., Mammoto, A., Kumar, R. y Alaoui-Jamali, M. A. (2010). Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion. *J Exp Med* 207, 2421-37.
- Yada, Y., Okano, Y. y Nozawa, Y. (1990). Enhancement of GTP gamma S-binding activity by cAMP-dependent phosphorylation of a filamin-like 250 kDa membrane protein in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 256-61.
- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 445-58.
- Yamada, K. M. y Even-Ram, S. (2002). Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat Cell Biol* 4, E75-E76.
- Zhang, W., Han, S. W., McKeel, D. W., Goate, A. y Wu, J. Y. (1998). Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *J Neurosci* 18, 914-22.
- Zhuang, Q. Q., Rosenberg, S., Lawrence, J. y Stracher, A. (1984). Role of actin binding protein phosphorylation in platelet cytoskeleton assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 118, 508-13.
- Zigmond, S. H. (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* 16, 99-105.



## **8. ANEXO I.VIDEO-MICROSCOPIA**

## **VIDEOS INCLUIDOS EN EL ANEXO I:**

**Videos 1:** Internalización de Cav1-GFP en células HeLa tras la pérdida de adhesión celular.

**Videos 2 y 3:** Movimiento de vesículas de Cav1-GFP en células HeLa con y sin FLNa.



## **9. ANEXO II. PUBLICACIONES**

### **Artículos que forman parte de la Tesis**

Echarri A\*, **Muriel O\***, and Del Pozo MA, [\* *These authors contributed equally to this work*]. *Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: Insights from integrin signaling*. Seminars in Cellular and Developmental Biology Vol18 (627-637).

**Muriel O**, Echarri A, Hellriegel C, Pavón DM, Beccari L and Del Pozo MA. *Phospho-filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics*. Journal of Cell Science. *In press*.

Echarri A, **Muriel O**, Pavón DM, Terrón MC, Martínez F, Llorca O, and Del Pozo MA. *Caveolin-1 organization and trafficking is regulated by Abl kinases and mDial*. Journal of Cell Science. *In review*.

### **Artículos que no forman parte de la Tesis**

Castro–Castro A, Ojeda V, Barreira M, Sauzeau V, Navarro–Lérida I, **Muriel O**, Couceiro JR, Felipe X, Pimentel–Muñoz FX, Del Pozo MA, and Bustelo XR. *A cytoskeletal-based feedback loop promoting Rac1 translocation and activation during cell signaling*. Embo Journal. *In review*.